

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 387 775**  
**A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 90104701.9

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/11, C12N 9/00**

(22) Anmeldetag: 13.03.90

(30) Priorität: 16.03.89 AT 609/89

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
19.09.90 Patentblatt 90/38(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE(71) Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM**  
**INTERNATIONAL G.M.B.H.****D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)**(72) Erfinder: **Beug, Hartmut, Dr.**  
**Kometengasse 11**  
**A-1140 Wien(AT)**  
Erfinder: **Birnstiel, Max L., Prof.-Dr.**  
**Grundäckergasse 49**  
**A-1100 Wien(AT)**  
Erfinder: **Cotten, Matthew, Dr.**  
**Maxingstrasse 22-24/3/8**  
**A-1130 Wien(AT)**  
Erfinder: **Wagner, Ernst, Dr.**  
**Strebersdorferstrasse 18**  
**A-2103 Langenzersdorf(AT)**  
Erfinder: **Kandolf, Harald, Dipl.-Ing.**  
**Garbergasse 4/15B**  
**A-1060 Wien(AT)**(54) **Genetische Einheiten zur Inhibierung der Funktion von RNA.**

(57) Die Erfindung betrifft eine, gegebenenfalls als Mehrfachkopie vorliegende, genetische Einheit zur Inhibierung von RNA. Die Einheit enthält die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten und eine für inhibierende RNA kodierende DNA, die innerhalb der Einheit so angeordnet ist, daß die transkribierte RNA Teil des Polymerase III-Transkripts ist. Mit Hilfe dieser Einheiten kann eine erhöhte Stabilität der inhibierenden RNA, die in Form von Ribozymen oder Antisense-RNAs vorliegen kann bei gleichzeitig unverminderter Aktivität erhalten werden kann.

Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Einführen der genetischen Einheiten in die Zelle, die Verwendung dieser Einheiten und sie enthaltende pharmazeutische Zubereitungen.

**EP 0 387 775 A1**

## Genetische Einheiten zur Inhibierung der Funktion von RNA

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die spezifische Inhibierung von RNA durch Wechselwirkung mit RNA.

Die spezifische Inhibierung von Genen durch Oligonukleotide, z.B. im Hinblick auf eine therapeutisch zu bewirkende Blockierung von deregulierten Onkogenen oder viralen Genen, beruht auf der Fähigkeit solcher komplementärer RNA- oder DNA-Sequenzen, sog. "Antisense-Oligonukleotide", mit mRNAs, Prozessierungssignalen oder pre-mRNAs zu hybridisieren und auf diese Weise die Informationsübertragung von Genen auf Proteine zu unterbrechen.

Die Anwendung von Antisense-DNA bewirkt einen Abbau von komplementärer Ziel-RNA durch RNase H-Spaltung des entstandenen Hybrids, das Ergebnis ist die irreversible Zerstörung der jeweiligen komplementären RNA.

Im Fall der Anwendung von Antisense-RNA erfolgt ein sog. "hybrider Arrest" von Translation oder Prozessierung, wobei die RNA/RNA Hybride das strukturelle Hindernis darstellen. Es wird angenommen, daß solche Hybride in der Zelle akkumulieren; ihr weiteres Schicksal wurde noch nicht untersucht. Nach gegenwärtigem Wissensstand dürfte es sich bei diesem Mechanismus im wesentlichen um ein reversibles Ereignis handeln. Die Anwendung von Antisense-RNA-Molekülen hat den Vorteil, daß diese Moleküle entweder in vitro synthetisiert und in die Zellen eingebracht werden können oder daß die dafür kodierenden Gene in die Zellen eingeführt werden können, sodaß die inhibierende RNA innerhalb der Zelle produziert werden kann. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, solche Gene in eine Form zu bringen, die die Produktion einer wirksamen Menge an Antisense RNA in der Zelle ermöglicht.

In jüngster Zeit wurde ein drittes Prinzip der RNA-Inhibierung entdeckt und der in vitro Anwendung zugänglich gemacht. Dieses Prinzip beruht auf der Fähigkeit von RNA-Molekülen, den sog. "Ribozymen", bestimmte RNA-Sequenzen zu erkennen, daran zu binden und sie zu spalten. Es wurde abgeleitet von in den in vivo beobachteten autokatalytischen Spaltreaktionen von RNA-Molekülen in Pflanzenviroiden und Satelliten-RNA.

Aufbauend auf bestimmten Strukturanforderungen für die Ribozym-katalysierte RNA-Spaltung können nunmehr de novo Ribozyme konstruiert werden, die eine auf eine bestimmte Zielsequenz gerichtete in trans Endonukleaseaktivität aufweisen. Da solche Ribozyme, von denen die bisher am eingehendsten erforschte wegen ihrer Struktur "hammer-head"-Ribozyme genannt werden, auf zahlreiche verschiedene Sequenzen wirken können, kann praktisch für jedes beliebige RNA-Substrat das entsprechende Ribozym "maßgeschneidert" werden. Dies macht Ribozyme zu interessanten, äußerst flexiblen Instrumenten für die Inhibierung spezifischer Gene und zu einer vielversprechenden Alternative zu Antisense-Konstrukten, welche bereits einen potentiellen therapeutischen Nutzen gezeigt haben.

Eines der derzeit bekannten, bisher am eingehendsten erforschte Ribozym-Modell umfaßt drei Strukturdomänen; aufbauend auf diesem Modell wurden bereits erfolgreich Ribozyme gegen die CAT-mRNA gebaut (Haseloff et al., 1988; Uhlenbeck et al., 1987):

Die drei Domänen umfassen:

a) eine hochkonservierte Region von Nukleotiden, die die Spaltstelle in 5'-Richtung flankiert. Dabei handelt es sich für gewöhnlich um die Sequenz GUC, wenngleich auch eine Modifikation in GUA oder GUU eine im wesentlichen unverminderte Spaltaktivität zeigte. Spaltung wurde auch nach den Sequenzen CUC, in geringerem Ausmaß auch für AUC und UUC gezeigt (die an die effiziente Spaltung gestellten Anforderungen wurden noch nicht zur Gänze aufgeklärt).

b) die in natürlich vorkommenden Spaltdomänen von Ribozymen enthaltenen hochkonservierten Sequenzen, die eine Art basengepaarten Stiel bilden;

c) die die Spaltstelle auf beiden Seiten flankierenden Regionen, die die exakte Anlagerung des Ribozyms in Relation zur Spaltstelle und um Zusammenhalt von Substrat und Enzym gewährleisten (in den bisher durchgeführten Versuchen wurden beidseitig je 8 Basen gewählt).

RNA-Enzyme können nach diesem Modell konstruiert werden und haben sich in vitro bereits als für die effiziente und spezifische Spaltung von RNA-Sequenzen als geeignet erwiesen (Haseloff et al., 1988).

In jüngster Zeit wurden weitere Typen von autokatalytischer RNA-Spaltaktivität, die für die zielgerichtete RNA-Inhibierung in Betracht kommen, entdeckt. Eines dieser Modelle ist das sog. "hairpin"-Ribozym, dessen aktive Stelle vom Minus-Strang der Satelliten RNA des Tabak-Ringspotvirus abgeleitet ist (Hampel und Tritz, 1989). Weitere selbst-spaltende RNA-Aktivitäten sind mit dem Hepatitis Delta Virus (Kuo et al., 1988; Sharmeen et al., 1988; Wu et al., 1989) und mit RNaseP (Altmann et al., 1988) assoziiert.

Die den Arbeiten zur vorliegenden Erfindung vorangegangenen Versuche dienten zum Vergleich der Wirkung von Antisense-RNA, Antisense-DNA und Ribozymen. Diese Versuche wurden mit Hilfe der snRNP

U7-abhängigen Histon-premRNA-Prozessierungsreaktion durchgeführt, und zwar in einem in vitro System, das U7-abhängig Histon-premRNA prozessiert (Mowry et al., 1987, Soldati et al., 1988). Dabei wurde gefunden, daß Antisense-RNA den stärksten Inhibitor darstellt, wobei die Inhibierung reversibel ist. Die Hemmwirkungen von Antisense-DNA und von Ribozymen vom "hammerhead"-Typ, beide irreversibel, lagen innerhalb derselben Größenordnung, wobei für die vollständige Hemmung jeweils ein ca. 1000 facher Überschuß gegenüber der Substrat-RNA benötigt wurde.

Während die bisherigen Versuche mit Ribozymen mit nackter RNA in proteinfreien Systemen durchgeführt worden waren, waren die Vorversuche zur vorliegenden Erfindung die ersten Experimente, die gezeigt haben, daß synthetisch hergestellte, auf eine spezifische Sequenz gerichtete Ribozyme auch in proteinhaltigem Milieu Spaltwirkung zeigen. Diese Tatsache lieferte einen ersten Hinweis für eine potentielle in vivo Anwendung.

Einer der limitierenden Faktoren bei der Anwendung von Ribozymen zur Inhibierung der Expression von spezifischen Genen dürfte im Aufbau einer Ribozymkonzentration gelegen sein, die ausreicht, die effiziente Ausschaltung einer bestimmten biologischen Reaktion zu bewirken; die Ursachen dafür dürften, ähnlich wie bei der Anwendung von Antisense-RNA, u.a. in der zu geringen Stabilität der RNA gelegen sein.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein System für die Anwendung von mRNA als in vivo Inhibitor von mRNA bereitzustellen, das die bisher bestehenden Beschränkungen bei der Anwendung von RNA beseitigt, indem eine wirksame Konzentration an inhibierender RNA in der Zelle zur Verfügung gestellt wird.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch eine genetische Einheit gelöst, die die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten und eine für die RNA-Funktion inhibierende RNA kodierende DNA enthält, die innerhalb der genetischen Einheit derart angeordnet ist, daß die inhibierende RNA Teil des Polymerase III-Transkripts ist.

Bei der Lösung dieser Aufgabe wurde von der Überlegung ausgegangen, daß durch Einführung eines die inhibierende RNA produzierenden Gens gegenüber dem Import der RNA als solchen eine beträchtliche Amplifikation der RNA und damit ein zur Hemmung der biologischen Reaktion ausreichender RNA-Vorrat gewährleistet würde.

Die inhibierende RNA kann ein beliebiges Ribozym oder eine andere mRNA inhibierende RNA, z.B. eine Antisense-RNA, sein.

Grundsätzlich wäre es denkbar, einen effizienten Transport von RNA bzw. der dafür kodierenden DNA-Sequenz über Viren oder virale Vektoren, z.B. Retroviren, durchzuführen.

Dieses System weist allerdings einige entscheidende Nachteile auf, wie Mobilisierung von endogenen Viren, Rekombination mit endogenen Retroviren, Aktivierung von endogenen Genen durch Integration, Beschränkung hinsichtlich Wirtsorganismus und Gewebsart.

Im Gegensatz dazu wurden daher erfindungsgemäß Carriergene bereitgestellt, die diese Nachteile nicht aufweisen.

Die als Carriergene für RNA-Gene im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorgeschlagenen Gene haben folgende Vorteile: sie weisen eine kompakte Struktur auf, können auf Grund ihrer geringen Größe leichter in die Zelle transportiert werden, weisen eine hohe Transkriptionsrate auf und sind in ihrer Expression nicht auf bestimmte Gewebe beschränkt, sondern werden ubiquitär, d.h. in beinahe allen Zelltypen exprimiert.

Ein weiterer Vorteil der Polymerase III-Gene liegt im Vorhandensein eines sehr starken Transkriptionsterminationssignals. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, daß ein in der Nähe gelegenes zelluläres Gen in unerwünschter Weise aktiviert wird, wesentlich reduziert.

Die von der Polymerase III transkribierten Gene haben folgende Eigenarten: es handelt sich dabei um Gene, deren Promotor sich nicht stromaufwärts vor dem Gen, sondern innerhalb des Gens befindet (Geiduschek et al., 1988). Diese für die Bindung der Polymerase III wesentlichen internen Kontrollregionen weisen eine diskontinuierliche Struktur auf; sie bestehen aus zwei sog. "Boxen" (der A-Box und der B-Box), die für die Erkennung durch die Transkriptionsfaktoren wesentlich sind, sowie einem dazwischenliegenden Genabschnitt, der hinsichtlich seiner Länge kritisch ist (Hofstetter et al., 1981). Die Länge dieser Sequenz beträgt bei tRNA-Genen 31-74 Basenpaare (Clarkson).

Vertreter dieser von Polymerase III transkribierten Gene sind die tRNA-Gene, 5S-RNA und eine Reihe von anderen kleinen Kern- und Zytoplasma-RNA-Genen: 7SK, 7SL, M, U6 und 4,5S RNA, sowie die Adenovirus-Gene VA1 und VA2 (Geiduschek et al., 1988). Gemeinsam ist diesen Genen ihre geringere Größe, ihre kompakte Struktur, ihre hohe Transkriptionsrate und ihre ubiquitäre Transkription.

Es wurde überraschend festgestellt, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen genetischen Einheiten eine erhöhte Stabilität der inhibierenden RNA erzielt werden kann, ohne daß eine Beeinträchtigung ihrer Wirksamkeit im Hinblick auf Aktivität in Kauf genommen werden muß.

Es wurde bereits von Jennings und Molloy, 1987, gezeigt, daß ein spezifischer von Polymerase III erkannter Promotor geeignet ist, die Synthese von Antisense-RNA zu lenken. Dazu wurde das XbaI/BamHI Fragment des VA1-Gens, enthaltend den Promotor, in 5' Richtung vor die Antisense-DNA kloniert, was dem herkömmlichen Prinzip bei der Verwendung von Polymerase II-Promotoren entspricht. Es wurde angestrebt, ein im Vergleich zu Polymerase II-Transkripten kurzes Transkript zu erhalten. Das Transkript weist nur eine geringfügige Modifikation auf, die eine Basenpaarung der Enden ermöglicht, um die Enden vor Verdau durch Einzelstrang-Exonukleasen zu schützen.

Im Gegensatz zu diesem Vorschlag, in dem nur die Promotorsequenz eines spezifischen Polymerase III-Gens verwendet wird, (der Bereich zwischen Pos.-30 bis 73, während das Wildtyp VA 1 Gen sich bis zur Terminatorsequenz bei Pos. +160 - +200 erstreckt), werden gemäß der vorliegenden Erfindung gezielt zusätzlich diejenigen Sequenzen des Polymerase III-Gens verwendet, die für die Sekundärstruktur des Transkripts maßgeblich sind, um diese für die Stabilisierung der inhibierenden RNA-Sequenzen auszunutzen. Im Gegensatz zum vorbeschriebenen Vorschlag ist die für die inhibierende RNA kodierende Gensequenz innerhalb des von Polymerase III transkribierten Gens so angeordnet, daß erfindungsgemäß eine "Genkassette" vorliegt. Darüberhinaus sind die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Carrier-Gene im Gegensatz zum viralen VA1-Gen nicht toxisch.

Die von Polymerase III transkribierten Gene sind im Rahmen der Erfindung flexibel einsetzbar. Im Hinblick auf ihre Funktion als Carriergene für RNA-inhibisierende Sequenzen sind bei der Auswahl bzw. Modifikation natürlicher bzw. bei der Konstruktion künstlicher Gene folgende Kriterien zu berücksichtigen:

- 1) die A- und die B-Box sind hoch konserviert.
- 2) Ein Abschnitt von 5 bis 7 T-Resten stromabwärts der B-Box ist für die Termination der Transkription verantwortlich.
- 3) Der Abstand zwischen A- und B-Box kann nicht beliebig vergrößert werden, wobei das Maximum derzeit bei etwa 90 bp angenommen wird.
- 4) In einigen Systemen hat die 5'-flankierende Sequenz einen Einfluß auf die Transkription.
- 5) Es gibt Hinweise dafür, daß eine intakte Anticodon-Stammregion wesentlich für die Stabilität des Transkripts ist.

Besonders geeignet als Carriergene für die Herstellung der erfindungsgemäßen genetischen Einheit sind tRNA-Gene. Die von diesen Genen kodierten RNAs sind darüberhinaus auf Grund ihrer Kleeblattstruktur als besonders geeignet anzusehen, der inhibierenden RNA Stabilität zu geben. Mit ihrer Hilfe lassen sich kompakte RNA produzierende Geneinheiten herstellen, indem die für die inhibierende RNA kodierende Sequenz zwischen den A- und B-Block eingeführt wird (Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines tRNA-Ribozymgens).

Versuche im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden mit der Startmethionin-tRNA durchgeführt, die eine Apa I-Restriktionsstelle in der zwischen A- und B-Block gelegenen Anticodon-Stamm- und Schleifenregion aufweist (die Startmethionin-tRNAs aller höheren Eukaryoten besitzen diese Restriktionsstelle in der Anticodon-Schleife).

Neben der zwischen A- und B-Block gelegenen Region sind auch andere Insertionsstellen innerhalb der Carrier-DNA-Sequenzen (tRNA-Gene oder andere Polymerase III-Gene) möglich, solange gewährleistet ist, daß Transkriptionsaktivität der Polymerase III und die Stabilität des Transkripts erhalten bleiben.

Die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten können jedoch grundsätzlich mit sämtlichen tRNAs hergestellt werden; erforderlichenfalls kann eine geeignete Restriktionsstelle konstruiert werden, in die dann die für die inhibierende RNA kodierende Sequenz inseriert wird. Bei der Insertion muß lediglich beachtet werden, daß in der Anticodon-Stammregion kein Basenaustausch vorgenommen wird, der die Transkriptionsrate des Gens oder die Stabilität der resultierenden tRNA beeinträchtigt (Folk et al., 1983). Außerdem muß dem Umstand Rechnung getragen werden, daß Inserts größer als 60 bp die Transkription beeinträchtigen können (Ciliberto et al., 1982).

Hinsichtlich der Wahl geeigneter Carriergene ist es grundsätzlich erstrebenswert, speziesspezifische tRNA-Gene oder andere von Polymerase III transkribierte Gene, die nicht toxisch sind, zu verwenden.

Die Versuche im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden durchgeführt, indem Ribozymsequenzen in normale tRNA-Gene eingeführt wurden. Wenn das tRNA-Ribozym, das von diesem Gen transkribiert wird, vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, es jedoch für bestimmte Anwendungen, z.B. um kernspezifische RNAs, z.B. solche von snRNP-Partikeln zu inhibieren, wünschenswert ist, das tRNA-Ribozym bzw. die tRNA-Ribozym bzw. die tRNA-Antisense-RNA im Kern zu lokalisieren, können Mutanten verwendet werden, die vorwiegend im Kern lokalisiert sind, z.B. das von Zasloff et al., 1982, und Zasloff, 1983, beschriebene met<sup>i</sup> tRNA-Gen, das einen einzigen Basenaustausch aufweist.

Die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten können z.B. wie folgt hergestellt werden:

Eine Kopie des von Polymerase III transkribierten Gens, z.B. eines tRNA-Gens, das auf einem

bakteriellen Plasmid enthalten ist, wird mit einem geeigneten Restriktionsenzym an der für die Insertion vorgesehenen Stelle, z.B. zwischen dem A- und dem B-Block, gespalten und die nach Standardmethoden hergestellte doppelsträngige DNA, kodierend für die inhibierende RNA, hineinligiert. Damit werden geeignete Wirtsorganismen transformiert, selektioniert, vermehrt und die amplifizierte Plasmid-DNA gewonnen. Die Plasmide werden auf das Vorhandensein der erfindungsgemäßen genetischen Einheit überprüft; dies kann durch Restriktionsverdau, Sequenzanalyse oder durch den Nachweis eines funktionellen in vitro Transkripts der Plasmid-DNA erfolgen.

Die so erhaltenen genetischen Einheiten können sowohl in Form des zirkulären Plasmids als auch in Form der aus dem Plasmid herausgeschnittenen Geneinheit, die sämtliche für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Informationen enthält, zur Anwendung gelangen.

Welche Form gewählt wird, richtet sich im allgemeinen nach dem Anwendungsgebiet und nach dem für die Einführung der Geneinheit in die Zelle gewählten Transportsystem.

Die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten können auch als Mehrfachkopien vorliegen (dabei handelt es sich um Tandemstrukturen, in denen die genetischen Einheiten mehrfach hintereinander angeordnet sind, wobei die inhibierenden Inserts gleich oder verschieden sein können).

Transkription eines solchen Tandems liefert auf Grund der in jeder einzelnen Einheit enthaltenen Promotor- und Terminationssignale voneinander getrennte RNA-Einheiten. Auf Grund dieser Eigenschaft der Fragmente, als jeweils komplette Transkriptionseinheiten vorzuliegen, ist auch die Orientierung der einzelnen Einheiten zueinander irrelevant. Bei der Herstellung solcher Tandems wird von Plasmiden ausgegangen, die multimere Kopien der für die inhibierenden Einheiten kodierenden Region enthalten. Multimere tRNA-Ribozymgene enthaltende Vektoren können z.B. hergestellt werden, indem, ausgehend von der im Beispiel 1 beschriebenen erbSchnitt-Serie, die Einzelfragmente unter Verwendung von T4 DNA-Ligase zu Polymeren ligiert und die polymeren Gene in eine entsprechende Restriktionsstelle eines geeigneten Plasmidvektors rekloniert werden. Die Herstellung solcher Tandems wird durch die geringe Größe der erfindungsgemäßen Einheiten, die vorzugsweise 200 bis 350 bp beträgt, ermöglicht. Mit Hilfe eines solchen "Tandem-Inhibitors" kann nach Herstellung eines heteromeren Komplexes von Antisense-RNAs oder Ribozymen in einem einzigen Versuch die Wirksamkeit eines Satzes von Inhibitoren getestet werden. Z.B. kann auf diese Weise eine Mischung von 5 bis 10 Ribozymen in ein Zellsystem eingeführt werden. Nachdem eine Inhibierung durch die Mischung erfolgt ist, können die einzelnen Ribozyme auf ihre Wirksamkeit untersucht werden. Dies ist insbesondere auf Grund der Tatsache von Vorteil, daß die Kriterien für die Auswahl von zu inhibierenden Ziel-RNA-Sequenzen noch nicht sämtlich erforscht sind.

Als gute Zielsequenzen sind z.B. solche Regionen, die keine Sekundärstruktur aufweisen, Regionen nahe Spaltsignalen, Regionen nach dem Initiationscodon, Regionen ohne Bindungsstellen für spezifische Proteine (wie z.B. Sm-Bindungsstelle in snRNA-Molekülen) anzusehen. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung, insbesondere bei Anwendung in Tandem-Form, wird ermöglicht, Aufschluß über solche Zielsequenzen zu erhalten und sie in der Folge effizient zu inhibieren.

Die Anwendung von Tandem-Einheiten ist auch dann von Vorteil, wenn es für die Inaktivierung von biologischen Prozessen erforderlich ist, die RNA, z.B. virale RNA, an mehreren Stellen zu spalten. Eine Mehrfachspaltung kann z.B. erzielt werden, indem eine größere Anzahl verschiedener Ribozyme konstruiert und ein Vektor, enthaltend die genetischen Einheiten mit den jeweils dafür kodierenden DNA-Sequenzen, in Zellen eingeführt wird. Bei Transkription dieser Sequenzen lagern sich die Ribozymeinheiten an die entsprechenden Zielsequenzen an, wodurch die mRNA in Bruchstücke gespalten wird.

Multimere Kopien können dann verwendet werden, wenn für die Wirksamkeit bei bestimmten Anwendungen, beispielsweise bei der Anwendung des Transferrin-Polykation-Transportsystems, größere Mengen eines niedrigmolekularen Ribozyms erforderlich sind. Plasmide, die multimere Kopien der genetischen Einheit tragen, die die für dieses Ribozym kodierende DNA-Sequenz enthalten, verbessern die Produktion des Fragments durch Erhöhung der Ausbeute um ein Mehrfaches.

Tandem-Einheiten können auch dann vorteilhaft eingesetzt werden, wenn gleichzeitig inhibierende RNAs bereitgestellt werden sollen, die gegen verschiedene RNA-Arten gerichtet sind.

Bei der Anwendung der Erfindung auf Antisense RNA ist zu beachten, daß bei tRNA-Genen die Größe des Inserts beschränkt ist. Im Hinblick auf effiziente Transkription liegt die Größenordnung bei ca. 60 bp; es werden daher bei Verwendung größerer Antisense-RNA-Konstrukte andere von Polymerase III transkribierte Gene, die hinsichtlich der Transkription längerer Sequenzen eine größere Kapazität aufweisen, in Betracht zu ziehen sein.

Die im Rahmen der Erfindung verwendbaren Carriergene können auch synthetisch hergestellt werden, sofern sie die Bedingung erfüllen, die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten aufzuweisen. Die Anwendung solcher synthetischen Gene kann folgende Vorteile mit sich bringen:

a) Solche Gene werden von Aminoacylsynthetasen und von Ribosomen nicht erkannt, wodurch ein Eingriff in die Translationsmaschinerie der Zelle verhindert wird.

b) Es besteht die Möglichkeit, durch die Schaffung synthetischer Konstrukte inhibierende RNAs mit größerer Stabilität und höherer Transkriptionsrate herzustellen als mit einem natürlichen Gen.

5 c) Der Klonierungsprozeß kann durch Schaffung synthetischer Sequenzen flexibler gestaltet werden. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß die Stabilität der Ribozym-tRNA-Moleküle erhöht werden kann, indem die Anticodon-Stammregion des Carrier-tDNA-Moleküls verlängert wird. Es konnte gezeigt werden, daß durch Verlängerung der 5 Basenpaare aufweisenden Anticodon-Stamm-Region des Wildtyp-tRNA-Gens auf 9 Basenpaare eine gegenüber dem verkürzten Wildtyp tRNA-Gen um das 6-fache erhöhte Menge an Transkript erzielbar ist, was auf eine Erhöhung der Stabilität und 10 die damit erzielbare Prozessierbarkeit zurückgeführt werden kann.

Es wurde weiters festgestellt, daß eine Erhöhung der Stabilität der erfindungsgemäßen genetischen Einheiten in Form von tRNA-Ribozym-Genen oder tRNA-Antisense-Genen auch erreicht werden kann, wenn die für die inhibierende RNA-Funktion kodierenden DNA-Sequenzen als Teil von Introns vorliegen (im Fall 15 von Ribozymen als "Ribintrons" bezeichnet). Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß natürlich vorkommende Introns die Sekundärstruktur von tRNA-Precursormolekülen nicht verändern und die tRNA-Introns keine Sequenzkonservierung zeigen, wodurch durch Klonierung von Ribozym- oder Antisense-Sequenzen als Teil von Introns die Strukturveränderung des resultierenden tRNA-Precursors minimiert und dessen Stabilität damit maximiert werden können. An Hand des im Rahmen der vorliegenden Erfindung 20 verwendeten tyr-tRNA-Gens, bei dem das Spleißen der tRNA-Precursormoleküle nur langsam erfolgt, konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung von "Ribintron"-Sequenzen enthaltenden tDNA-Molekülen die Aktivität von rib-tRNA wirkungsvoll erhöht werden kann. Damit ist es möglich, verstärkt im Zytoplasma lokalisierte RNAs anzugreifen. Dieses System ermöglicht auf einfache Weise den Einbau geeigneter Strukturelemente zur Erhöhung der Stabilität der "Ribintrons" gegenüber dem Abbau durch Exonukleasen. 25 Dies kann z.B. durch zusätzliche Basenpaarungen oder durch größere Hairpin-Bereiche angrenzend an die Ribozymsequenzen erzielt werden. Bei derartigen Modifikationen ist zu beachten, daß die für das Splicing des Introns maßgeblichen Strukturen erhalten bleiben.

Die natürlichen Intronsequenzen können modifiziert werden, z.B. durch Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen, um die Klonierung von Oligonukleotiden zu ermöglichen, oder, soweit nicht im natürlich 30 vorkommenden Gen enthalten, durch Einfügen von Nukleotiden, die eine Basenpaarung mit dem Anticodon-Triplett ermöglichen, um über ein zusätzlich stabilisierendes Strukturmerkmal zu verfügen.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, daß die Expression von Ribozymen als Bestandteil von Introns im wesentlichen keine Beeinträchtigung der tRNA-Sekundärstruktur mit sich 35 bringt, wodurch das entstehende Transkript in hoher Konzentration akkumuliert und korrekt prozessiert werden kann. Falls sich das während des Prozessierens freigesetzte Intron als nicht genügend stabil erweist, können geeignete Strukturmerkmale vorgesehen werden, die eine Erhöhung der Stabilität gegenüber Exonukleaseabbau bewirken.

Um die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten in die Zelle einzubringen, sind mehrere Methoden anwendbar:

40 Die Standardmethode zum Einführen von DNA in Gewebekulturzellen benutzt die Bildung eines Co-Präzipitats zwischen der DNA und Calciumphosphat (Graham et al., 1973). Das Präzipitat wird Zellen beigegeben, die einen bestimmten Anteil aufnehmen, möglicherweise durch einen Pynozytose-Vorgang. Eine ähnliche Methode benutzt ein positiv geladenes Material, DEAE-Dextran, das die Aufnahme von DNA durch die Zelle erleichtert. Es wurden auch Methoden entwickelt, DNA durch Elektroporation (dabei 45 entstehen durch ein pulsierendes elektrisches Feld vorübergehend Poren) in die Zelle zu bringen (Langridge et al., 1987, Fromm et al., 1987). Mikroinjektionstechniken für die Einführung in große Zellen (Kressmann et al., 1980) und Gewebekulturzellen (Pepperkok et al., 1988) sind ebenfalls anwendbar. Diese Methoden sind jedoch nur im Labor bzw. für in vitro Anwendungen brauchbar. Kürzlich wurde ein 50 synthetisches kationisches Peptid (DOTMA) entwickelt, das spontan mit DNA Liposomen bildet und so den Transport in die Zellen erleichtert (Felgner et al., 1987). Grundsätzlich sind, wie bereits erwähnt, auch retrovirale Vektoren für den Transfer von genetischen Material in die Zelle geeignet (Stewart et al., 1986, 1987); diese Systeme weisen jedoch die bereits angeführten Nachteile auf.

Ein weiterer Transportmechanismus beruht auf der Benutzung "entwaffneter" Toxine als Transportvehikel.

55 Die bisher verwendeten Transportverfahren sind sämtlich von dem Mangel behaftet, nicht genügend inhibierende Nukleinsäure in die Zelle befördern zu können. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es nunmehr aufgrund der geringen Größe und der Kompaktheit der Moleküle möglich, bezogen auf die Transportkapazität eine Steigerung der Zahl an aktiven Inhibitoreinheiten zu erzielen. Aufgrund der geringen

Größe und kompakten Struktur der erfindungsgemäßen genetischen Einheiten kann nach geringfügigen Modifikationen, z.B. Konjugation mit Cholesterin, lipophilen Gegenionen oder Kernlokalisierungspeptiden auch auf ein Transportsystem zur Gänze verzichtet werden.

5 Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein lösliches System für den Transport angewendet, das über Rezeptor-vermittelte Endozytose abläuft. Besonders bevorzugt wird dabei ein Transferrin-Polykation-Konjugat mit der erfindungsgemäßen genetischen Einheit komplexiert; der Komplex wird durch den Transferrin-Rezeptor, der auf praktisch allen wachsenden Zellen vorhanden ist, aufgenommen.

10 Die Anwendungsgebiete für die vorliegende Erfindung sind zahlreich: z.B. können transgene Tiere hergestellt werden, die auf Grund des Vorhandenseins der erfindungsgemäßen genetischen Einheiten im genetischen Material eine intrazelluläre Immunität gegen Viren, z.B. Maul- und Klauenseuchevirus, Newcastle Disease Virus, Rinderpapillomavirus, Pseudorabies oder infektiöse Gastroenteritis, aufweisen. Entsprechend kann auch in transgenen Pflanzen intrazelluläre Immunität, z.B. gegen das Kartoffelvirus PVX, erzeugt werden.

15 Weiters können die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten in somatische Zellen eingebracht werden, um gegen pathogene Viren, wie HIV oder verwandte Retroviren gerichtete Ribozyme bzw. Antisense-RNAs zur Bekämpfung dieser viralen Erreger einzusetzen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt in der Gentherapie durch Anwendung von RNA Konstrukten mit Komplementarität zu Oncogenen oder anderen Schlüsselgenen, die Wachstum und/oder Differenzierung von Zellen kontrollieren. Bei derartigen Anwendungen kommt die mit Hilfe der vorliegenden Erfindung wirksam erzielbare hohe Spezifität der RNA-Inhibierung, mit Hilfe derer z.B. eine Unterscheidung zwischen Protooncogen- und Oncogentranskripten möglich ist, zum Tragen.

Weiters können die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten verwendet werden, um in Pflanzen oder Tieren die Expression von spezifischen Genen zu verhindern, um auf diese Weise erwünschte Eigenschaften hervorzubringen.

25 Die inhibierende Wirkung von RNA kann auch bei der Bekämpfung von Krankheiten derart ausgenutzt werden, daß die Produktion von unerwünschten Genprodukten unterbunden wird, z.B. die Produktion des bei der Alzheimer-Krankheit auftretenden Haupt-Plaquesproteins ("major plaque protein") oder von Autoimmunerkrankungen verursachenden Proteinen.

30 Die vorliegende Erfindung kann auch in denjenigen Fällen angewendet werden, in denen ein regulatorisches Protein, das eine Wechselwirkung mit RNA aufweist, durch Anlagerung von RNA ausgeschaltet werden soll.

Pharmazeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen genetischen Einheiten als wirksame Komponente enthalten, etwa in Form von Lyophilisaten, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Ihre Anwendung umfaßt die angegebenen Indikationsgebiete.

35 Anhand der im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuche konnte Transkriptionsaktivität des tDNA-Ribozymgens nachgewiesen werden. Dazu wurde ein tDNA-Ribozym-Genkonstrukt hergestellt, indem eine für ein 53 bp langes, gegen die snRNA U7 Sequenz gerichtetes Ribozym kodierende DNA-Sequenz in die Apal Restriktionsstelle zwischen die A-Box und die B-Box der Start-Methionin-tDNA inseriert wurde (die A- und die B-Box sind die beiden Erkennungssequenzen für die Polymerase; die 40 Transkription beginnt 15 bp stromaufwärts der A-Box und endet an einer Oligo T-Sequenz stromabwärts der B-Box). Nach Mikroinjektion dieses Gens wurde Transkription nachgewiesen; die Konzentration des tRNA/Ribozym-Hybrids betrug 10-20 % der Konzentration an tRNA, die von einem co-injizierten Wildtyp-tRNA-Gen produziert wurde.

45 RNA-Moleküle, synthetisiert in vitro vom tRNA-Ribozymgen, spalten die Ziel-RNA an der vorgesehenen Stelle. Das Hinzufügen der tRNA-Struktur zur Ribozymsequenz blockiert nicht die Ribozymaktivität. tRNA-Ribozymmoleküle, synthetisiert von Genen, die in Oozyten injiziert worden sind, spalten die Ziel-RNA ebenfalls an der vorgesehenen Stelle und mit derselben Effektivität wie in vitro synthetisierte Ribozyme ohne die zusätzliche tRNA-Struktur. Das beweist, daß in vivo Synthese und Prozessierung eines tRNA- 50 Ribozyms nicht mit Modifikationen einhergehen, die die Wirkung des Ribozyms behindern.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde erstmals in vivo die Aktivität eines Ribozyms nachgewiesen. Dazu wurden tDNA/Ribozym-Gene zusammen mit radioaktiv markiertem GTP in den Kern von Oozyten injiziert. Nach achtstündiger Inkubation, die für die Ribozymsynthese vorgesehen war, wurde die radioaktiv markierte Substrat-RNA (U7 RNA) ins Zytoplasma der Oozyten injiziert. Nach weiteren zwei Stunden wurde 55 die Nukleinsäure aus den Oozyten präpariert: In den Oozyten, in denen Ribozymsynthese stattgefunden hatte, wurde keine verbleibende Substrat-RNA nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war die Substrat-RNA in denjenigen Oozyten stabil, die nicht mit dem tDNA/Ribozymgen injiziert worden waren bzw. bei denen das Gen den Kern verfehlt hatte.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen tDNA-Ribozyme die transformierende Wirkung eines Onkogens inhibieren können. Anhand von erythroiden Hühnerzellen, transformiert mit dem erbB-Onkogen, wurde die Aktivität eines tRNA-Ribozyms über die durch Inhibierung der erbB Expression eintretende Differenzierung der Zellen in Erythrozyten nachgewiesen.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen genetischen Einheiten kann auch durch Beobachtung der Resistenz von Mauszellen gegen Infektionen, beispielsweise Polyomainfektionen, nach Anwendung von erfindungsgemäßen genetischen Einheiten, die gegen das Virus (gegebenenfalls gegen mehrere Regionen), z.B. gegen das Papilloma-Virus gerichtet sind, überprüft werden.

#### Beispiel 1

#### Konstruktion von tRNA Ribozymgenen

##### a) Konstruktion von pSPT18met1

Das Methionin-Initiator 1-tRNA-Gen von *Xenopus*, vorhanden auf einem 284 bp EcoRI-Fragment, das in pBR322 kloniert war (das HinfI H-G-Fragment (Hofstetter et al., 1981, Telford et al. 1979), wurde durch EcoRI Verdau des pBR322 Vektors isoliert, durch Gelelektrophorese (2 % Agarose/TBE) gereinigt und in die EcoRI Stelle des bakteriellen Plasmids pSPT18 (Boehringer Mannheim) so ligiert, daß bei Transkription des Plasmids mit SP6-Polymerase ein Sense-tRNA-Transkript erhalten wurde. Dazu wurden Standardklonierungsmethoden, beschrieben in (Maniatis), verwendet. Der Hauptvorteil der Reklonierung des tRNA-Gens in pSPT18 liegt im Vorhandensein von einander gegenüberliegenden SP6- und T7-RNA Polymerase-Promotoren auf dem Plasmid. Daher können durch in vitro Transkription spezifische RNA-Transkripte, die entweder die tRNA-Ribozymsequenz oder die dazu komplementäre Sequenz enthalten, erhalten werden (Melton et al., 1984). Diese Transkripte sind nützlich, um die Spaltaktivität des RNA-Moleküls zu testen oder um durch ein "RNase Protection Mapping" die Anwesenheit von tRNA-Ribozymen in Zellextrakten, die das tRNA-Ribozym exprimieren, nachzuweisen.

##### b) Konstruktion von tRNA-Ribozymgenen

Das tRNA-Gen auf pSPT18met1 wurde an der einzigen Apal Stelle in der Anticodon-Stamm- und Schleifenregion gespalten (s. Fig. 2). Diese Abbildung zeigt Plasmide, die die für tRNA-Ribozym-kodierende Sequenzen enthalten. pSPT18 met1 enthält das 284 bp EcoRI-Fragment, das das *Xenopus laevis* Initiator-tRNA-Gen trägt. Dabei handelt es sich um das G-H Fragment (Hofstetter et al., 1981), kloniert in die EcoRI-Stelle des Polylinkers von pSPT18. Die komplementären Oligonukleotide, kodierend für Ribozyme, die gegen U7snRNA (CD33 und die beiden Sequenzen der erbB-mRNA (ES13, ES53) gerichtet sind, werden gezeigt. Die hier verwendete Klonierungsstrategie ergab die Entfernung der überstehenden Enden der Apal-Stelle im tRNA-Gen. Der Anteil des Inserts, kodierend für das Ribozym und die zur Ziel-RNA komplementären Regionen (Anti-U7, Anti-erbB) ist gekennzeichnet, ebenso wie die A- und B-Box, der Abschnitt der 5' T-Reste (Terminationssignal) und die Transkriptionsinitiationsstellen. Das Plasmid enthält den ColEI Replikationsursprung, einen Ampicillinresistenz-marker und die Promotoren für T7- und SP6-RNA-Polymerase.

Zur Herstellung doppelsträngiger synthetischer DNA-Oligonukleotide, kodierend für die viroide Spaltsequenz (Haseloff et al., 1988) flankiert von den zur Ziel-mRNA komplementären Sequenzen, wurden zunächst einzelsträngige Oligonukleotide nach Standardmethoden (Applied Biosystems DNA synthesizer) hergestellt. Komplementäre Oligonukleotide wurden phosphoryliert, annealt und in das Apal gespaltene pSPT18met1 Plasmid unter Verwendung von Standardmethoden hineinligiert (Maniatis). Die Ligationsmischung wurde zur Transformation von *E. coli* HP101 verwendet, Bakterienklone, die das neue Plasmid enthielten, wurden isoliert und das Vorhandensein von aktiven Ribozymsequenzen auf dem bakteriellen Plasmid auf zwei Arten bestätigt:

1) RNA-Moleküle, die von der in vitro SP6-Transkription klonierter DNA-Plasmide stammten, wurden mit einer radioaktiv markierten RNA, enthaltend die Zielsequenz für das Ribozym, inkubiert und auf spezifische Spaltung der Ziel-RNA getestet (s. Fig. 4).

2) Das Vorhandensein korrekt inserierter DNA-Sequenzen wurde durch Dideoxy-DNA-Sequenzierung



über die Insertionsstelle bestätigt.

Fig. 4 zeigt die in vitro Ribozymaktivität der tRNA-Ribozyme. Plasmid-DNA-Moleküle, die die erbSchnitt-tRNA-Ribozyme ES13 und ES53 trugen, wurden mit PvuII verdaut und mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Diese Transkription lieferte 230 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die die tRNA-Ribozymsequenz und zusätzlich die 5'- und 3' flankierenden Sequenzen, die von den flankierenden Xenopussequenzen und den flankierenden bakteriellen Plasmidsequenzen stammen, enthalten (s. Fig. 2). Die Ribozymtranskripte wurden mit 20.000 cpm (20 fM) eines RNA-Moleküls mit der Region der erbB-mRNA, umfassend das Initiationscodon, inkubiert. Das RNA-Molekül besitzt die Zielsequenzen sowohl für ES13 und ES53 (s. Fig. 3). Nach 2stündiger Inkubation des Ribozyms plus Ziel-RNA bei 37 °C in Gegenwart von 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 und 150 mM NaCl, wurde EDTA zu einer Konzentration von 15 mM zugefügt, die Probe getrocknet, in 80% Formamid/TBE gelöst, 30 sek. bei 95 °C erhitzt und auf einem 9,5% Acrylamid/8,3 M Harnstoff/ TBE-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die markierten RNA-Moleküle durch Autoradiographie nachgewiesen.

Spur M: Molekulargewichtsmarker: pBR322 DNA, gespalten mit HpaII und unter Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase mit alpha-<sup>32</sup>P-CTP radioaktiv markiert (Maniatis). Die Molekulargewichtsmarker wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel in 80% Formamid/TBE gelöst und 3 min. bei 95 °C erhitzt. Die Molekulargewichte einiger der Fragmente (in Nukleotiden) sind links angegeben.

Spur 1: erbB-Ziel-mRNA (20.000 cpm, 20 fM) ohne Inkubation.

Spur 3: erbB-Ziel-mRNA (20.000 cpm, 20 fM), inkubiert mit MgCl<sub>2</sub> bei 37 °C ohne Ribozyme.

20 Spur 4: erbB-Ziel-mRNA (20.000 cpm, 20 fM), inkubiert mit ES13-RNA (1 fM).

Spur 5: erbB-Ziel-mRNA (20.000 cpm, 20 fM), inkubiert mit ES53-RNA.

Rechts von der Fig. sind die Molekulargewichte (in Nukleotiden) der erbB-Ziel-mRNA und der 5'- und 3' Spaltprodukte beider Ribozymspaltreaktionen angegeben. (s. auch Fig. 3)

Fig. 3 zeigt die Komplementarität zwischen Ribozymen und Ziel-RNAs: CD33 (A) gegen U7snRNA Cotten et al., 1988), ES13 (C) und ES53 (B) gegen Sequenzen der erbBmRNA (Venustrom et al., 1980).

Der tRNA-Anteil der tRNA-Ribozyme ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Spaltstellen für das Ribozym sind gekennzeichnet, ebenso die Initiationscodons der erbB-mRNA.

## 30 Beispiel 2

tRNA-Ribozymtranskription in Xenopus Oozyten.

Die Transkription der tRNA-Ribozymgene, mikroinjiziert in Xenopus-Oozyten, wurde nach der in (Kressmann et al., 1978, Hofstetter et al., 1981, Kressmann et al. 1980) für tDNA beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurde wie folgt vorgegangen: Stadium VI Oozyten wurden erhalten von HCG (Humanes Chorion Gonadotropin)-stimulierten erwachsenen Xenopus laevis Weibchen. Die Oozyten wurden kurz zentrifugiert, um den Kern an den Rand der Oocyte zu bringen. Jeder Kern wurde mit ca. 50 nl einer Lösung, enthaltend 0,3 µg/µl supercoiled Plasmid DNA (enthaltend das tRNA-Ribozymgen gemäß Beispiel 1) und 2 µCi/µl <sup>32</sup>P-GTP injiziert. Nach 5 bis 8 stündiger Inkubation bei 20 °C wurden die einzelnen injizierten Oozyten in 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8, 20 mM EDTA (400 µl/Oocyte) bei 37 °C 45 min. verdaut, einmal mit Phenol und einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die gesammelten Ethanol-Präzipitate wurden in 80% Formamid/TBE gelöst, kurz zwecks Denaturierung bei 95 °C erhitzt und durch Elektrophorese auf einem 10% Acrylamid/8,3 M Harnstoff/TBE-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Bei allen Versuchen mit tRNA-Ribozymgenen erhielten die Injektionslösungen das Wildtyp metRNA Gen mit einer Konzentration von 1/6 der Konzentration des tRNA-Ribozymgens. TBE-Puffer (Tris, Borat, EDTA) wurde nach der Vorschrift, beschrieben in (Maniatis), hergestellt.

50 Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Fig. 5:

Spur m: Molekulargewichtsmarker: wie in Fig. 4. Die Molekulargewichte einiger der Fragmente (in Nukleotiden) sind links in der Fig. angegeben. Spuren 1,2,3: Die Nukleinsäure von einzelnen Oozyten, injiziert mit dem Met-tRNA-Gen und dem Met-tRNA- Ribozymgen metribo 33. Rechts in der Figur sind die Positionen der Met-tRNA (met,77 Nukleotide lang) und des tRNA-Ribozyms (met ribo), 128 Nukleotide lang) angegeben.

## Beispiel 3

Bestimmung der Ribozymaktivität von Oozyten synthetisiertem tRNA-Ribozym im Vergleich mit in vitro synthetisiertem Ribozym, das keine tRNA-Sequenzen aufweist.

Ein gegen U7 gerichtetes tRNA-Ribozym, synthetisiert in mikroinjizierten Oozyten wurde durch Auftrennung mittels Elektrophorese erhalten, durch Autoradiographie sichtbar gemacht, aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und durch Inkubation über Nacht in einem Eppendorf Vibrator in HEP ("Heidelberg Extraktionspuffer": 0,75 M Ammonium-acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 % (Vol./Vol.) Phenol, 0,1 % (Gew./Vol.) SDS, 0,1 mM EDTA) eluiert. Die eluierte RNA wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol in Gegenwart von 10 µg E.coli tRNA als Träger gefällt. Das Präzipitat wurde aufgenommen und mittels Cerenkov-Zählung der <sup>32</sup>P-Markierung unter Verwendung der Werte für die spezifische Aktivität (Kressmann et al., 1982) quantitativ bestimmt. Proben des tRNA-Ribozyms wurden mit <sup>32</sup>P-markierter RNA, enthaltend die U7-Sequenz (10.000 cpm/Probe, 10 fM plus die angegebenen Mengen an unmarkierter U7-RNA) 2h bei 37 °C in Anwesenheit von 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zusatz von EDTA auf 15 mM gestoppt, die Proben wurden getrocknet, in 80% Formamid/TBE gelöst, bei 95 °C 30 sek. erhitzt und auf einem vorgewärmten 9,5 % Acrylamid/ 8,3 M Harnstoff/ TBE-Gel aufgetrennt. Die radioaktiv markierten RNA-Arten wurden durch Autoradiographie bei -80 °C mit einer Dr. Goos "special" Verstärkerfolie sichtbar gemacht.

Das Ribozym CD32 wurde erhalten durch T7-Polymerase-Transkription eines Plasmids, enthaltend das Insert von CD33 (s. Fig. 2) und kloniert in die Hind III/Sal I-Stellen von pSPT19 (Boehringer Mannheim). Dieses Transkript enthält nur die Ribozymsequenz plus die zu U7 komplementären Sequenzen, flankiert von kurzen Abschnitten der Vektorsequenz. Die Spaltaktivität dieses Ribozyms wurde als Vergleich mit der Spaltaktivität des oozytensynthetisierten tRNA-Ribozyms CD 33 herangezogen, um den Einfluß der Sekundärstruktur der tRNA sowie der in vivo Synthese und -Modifikation auf die Ribozymaktivität zu beurteilen. Es zeigte sich, daß beide Ribozyme (CD 32 und CD 33) die U7-Sequenz enthaltende RNA (94 Nukleotide lang) in ein 5'-Spaltprodukt von 25 Nukleotiden und ein 3'-Spaltprodukt von 69 Nukleotiden spalten.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Fig. 6:

Spuren m: Molekulargewichtsmarker analog Fig. 5

Spur 1: U7-RNA (10.000 cpm, 10 fM), inkubiert ohne Ribozym.

Spur 2: U7-RNA (10.000 cpm, 100 fM), inkubiert mit 10 fM des oozyten-synthetisierten tRNA-Ribozyms CD33

Spur 3: U7-RNA (10.000 cpm, 1 pM), inkubiert mit 10 fM oozyten-synthetisiertem tRNA-Ribozym CD33.

Spur 4: U7-RNA (10.000 cpm, 100 fM), inkubiert mit 10 fM von in vitro mit T7-Polymerase synthetisiertem Ribozym CD32.

Spur 5: U7-RNA (10.000 cpm, 100 fM), inkubiert mit 1 fM von in vitro mit T7-Polymerase synthetisiertem Ribozym CD32.

Beispiel 4:

Bestimmung der Spaltung von Ribozymsubstrat in Oozyten

Eine Mischung von <sup>32</sup>P-GTP, Anti U7-tRNA-Ribozymgen und das Met-tRNA-Gen wurden in Oozytenkerne injiziert. Die injizierten Oozyten wurden, wie in Beispiel 2 beschrieben, bei 20 °C 8 h inkubiert, um Transkription stattfinden zu lassen. Daraufhin wurde radioaktiv markierte U7-RNA (50 nL, 100.000 cpm/µL, 100 fM/µL) ins Cytoplasma der Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden daraufhin 2 h lang inkubiert. Die Präparation der Nukleinsäuren von einzelnen Oozyten und ihre Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurden durchgeführt wie in oben beschrieben.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Fig. 7:

Spuren m: Molekulargewichtsmarker wie Fig. 5

Spur 1: Nukleinsäuren aus einer Oozyte injiziert mit den Met- und Metribo-Genen

Spuren 2 und 3: Oozyten, injiziert mit Met und Metribo, gefolgt von U7-RNA-Injektion.

Spuren 4 und 5: Oozyten, nur mit U7-RNA injiziert.

Spur 6: Ein Aliquot der U7-RNA verwendet für die Injektion.

Spur 7: U7-RNA (10 fM), inkubiert mit dem Ribozym CD32 (10 fM) während 2h bei 37 °C in Gegenwart von 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Tris-HCl, pH 7,5. Wegen der Gelbedingungen ist nur das 3'-Spaltprodukt (69 Nukleotide) gezeigt.

## Beispiel 5:

## Transkriptionsaktivität von tRNA-Ribozymen in Hühnerzellen

5

Plasmid-DNA-Moleküle, enthaltend die tRNA-Ribozymgene wurden in Hühnerzellen eingeführt, um die Transkriptionsaktivität der Gene zu bestimmen. Es wurde gezeigt, daß das tRNA-Ribozymgen (abgeleitet von einem *Xenopus*-tRNA-Gen) in Hühnerzellen effizient transkribiert wird. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:  $10^6$  primäre Hühnerembryo-Fibroblastenzellen (Zenke et al., 1988) wurden pro 10 cm-Schale nach Standardmethode ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Am Morgen wurde jede Schale mit  $10\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (enthaltend entweder erbBSchnitt 13 oder ebrBSchnitt 53) unter Verwendung der Calciumphosphat-Coprazipitations-Methode (Graham et al., 1973) transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht dem Präzipitat ausgesetzt, am darauffolgenden Morgen zweimal mit frischen Medium gewaschen und weitere 48 h in frischen Medium inkubiert. Das Medium wurde daraufhin entfernt, die Zellen in PK/SDS-Puffer (s. oben) aufgenommen und die Nukleinsäure gewonnen. Daraufhin wurde die Nukleinsäure einem "RNase Protection Mapping" unter Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -markierten Antisense erbBSchnitt 13 oder erbBSchnitt 53 RNA-Sonden unterzogen, um die Anwesenheit von tRNA-Ribozym-Transkripten nachzuweisen. Markierte RNA ( $10.000\text{ cpm}/10\text{ fM}$  Antisense-RNA pro Probe) wurde dem getrockneten Ethanolpräzipitat zugefügt, die Probe abermals getrocknet und in  $10\text{ }\mu\text{l}$  80% entionisiertem Formamid,  $400\text{ mM}$  NaCl,  $20\text{ mM}$  PIPES, pH 6,5,  $10\text{ mM}$  EDTA gelöst. Die Proben wurden mit sterilem Paraffinöl überschichtet, 3 min. bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und rasch in ein  $45^\circ\text{C}$  Wasserbad überführt, in dem über Nacht bebrütet wurde. Am Morgen wurden  $0,3\text{ ml}$  eiskaltes NaCl ( $300\text{ mM}$ ),  $30\text{ mM}$  Tris, pH 7,5,  $1\text{ mM}$  EDTA,  $0,05\text{ mg/ml}$  RNase A und  $80\text{ Einheiten/ml}$  RNase T1, unter rascher, vorsichtiger Bewegung zugefügt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 45 min. bebrütet. Proteinase K und SDS wurden auf  $1\text{ mg/ml}$  und  $0,5\%$  zugefügt, die Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend bei  $56^\circ\text{C}$  je 20 min. fortgesetzt. Die Probe wurde nach Zusatz von  $10\text{ }\mu\text{g}$  tRNA mit Ethanol gefällt. Der aufgenommene Niederschlag wurde in 80% Formamid/TBE aufgenommen und auf einem vorgewärmten 9,5 % Acrylamid/8,3 M Harnstoff/TBE-Gel aufgetrennt.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Fig. 8:

Spuren m: Molekulargewichtsmarker wie in den vorangegangenen Beispielen

30 Spur 1: Antisense ES 13-Sonde, hybridisiert mit *E.coli* tRNA ( $10\text{ }\mu\text{g}$ )

Spur 2: Antisense ES 53-Sonde, hybridisiert mit *E.coli* tRNA

Spuren 3 und 4: Mapping der Nukleinsäuren von 10 000 und 100 000 Zellen, die nicht mit Plasmid DNA, hybridisiert mit der ES 13 Sonde, transfiziert waren

35 Spuren 5 und 6: Mapping der Nukleinsäuren von 10 000 und 100 000 Zellen, transfiziert mit ES 13, hybridisiert mit der ES 13-Sonde.

Spuren 7 und 8: Mapping der Nukleinsäure von 10 000 und 100 000 Zellen, transfiziert mit ES 53, das mit der ES 53-Sonde hybridisiert worden war.

## 40 Beispiel 6

Schwächung der Wirkung des v-erb B Onkogens durch tDNA Ribozym-Gene, die mit Hilfe von Polylysin-Transferrin-Konjugaten in v-erb B transformierte Erythroblasten eingebracht wurden.

45 Anhand dieses Beispiels konnte gezeigt werden, daß tDNA-Ribozyme, die gegen das erb B Onkogen gerichtet sind, mit Hilfe von Polylysin-Transferrin-Konjugaten in erb B-transformierte Hühner-erythroblasten eingebracht werden und die transformierende Wirkung des Onkogens schwächen können.

## Vorversuch 1

50

## Herstellung von Transferrin - Polylysin - Konjugaten

Die Kopplung erfolgte analog literaturbekannter Methoden (vgl. G. Jung, W. Köhnlein und G. Lüders, 55 Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 (1981), 599 ) durch Einführung von Disulfidbrücken nach Modifizierung mit Succinimidylpyridyldithiopropionat.

## Pyridyldithiopropionat - modifiziertes Transferrin 1:

6 ml einer über Sephadex G-25 gelfiltrierten Lösung von 120 mg ( 1.5  $\mu$ mol) Transferrin ( aus Hühnereiweiß, Sigma, Conalbumin Type I, eisenfrei) in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer ( pH 7.9) wurden  
 5 unter gutem Schütteln mit 200  $\mu$ l einer 15 mM ethanolischen Lösung von Succinimidylpyridyldithiopropionat (SPDP, Pharmacia) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln reagieren gelassen. Über eine Gelsäule (Sephadex G-25, 14 x 180 mm, 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7.8 ) wurden niedermolekulare Reaktionsprodukte und Reagensreste abgetrennt und dabei 7 ml der Produktfraktion erhalten; der Gehalt von an Transferrin gebundenem Pyridyldithiopropionatresten wurde anhand eines  
 10 Aliquots nach Reduktion mit Dithiothreitol durch photometrische Bestimmung der Menge an freigesetztem Pyridin-2-thion ermittelt und betrug ca 2.6  $\mu$ mol.

## Mercaptopropionat - modifiziertes Polylysin 2:

15 Eine Lösung von 18 mg (ca 1.0  $\mu$ Mol) Poly(L)Lysin -Hydrobromid (Sigma, Fluoresceinisothiocyanat ( = FITC ) - markiert, Molekulargewicht ca 18000 / entspricht einem durchschnittlichem Polymerisationsgrad ca 90 ) in 3 ml 0.1 M Natriumphosphat (pH 7.8) wurde über Sephadex G-25 filtriert. Die Polylysin-Lösung wurde mit Wasser auf 7 ml verdünnt, unter gutem Schütteln mit 270  $\mu$ l einer 15 mM ethanolischen Lösung  
 20 von SPDP versetzt, und 1 h in der Dunkelheit bei Raumtemperatur und unter gelegentlichem Schütteln reagieren gelassen. Nach Zugabe von 0.5 ml 1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5.0) wurde zur Abtrennung von niedermolekularen Substanzen über Sephadex G-25 filtriert (Eluens : 20 mM Natriumacetat-Puffer pH 5.0). Die Produktfraktion (Ninhydrinfärbung, Fluoreszenz) wurde i.Vak. eingeeengt, mit Puffer auf pH ca 7 gebracht, eine Lösung von 23 mg (150  $\mu$ mol) Dithiothreitol in 200  $\mu$ l Wasser zugegeben und 1 h bei  
 25 Raumtemp. unter Argon in der Dunkelheit stehen gelassen. Durch weitere Gelfiltration (Sephadex G-25, 14 x 130 mm Säule, 10 mM Natrium-acetat-Puffer pH 5.0) wurde von überschüssigem Reduktionsmittel abgetrennt und man erhielt 3.5 ml Produktlösung an Fluoreszenz-markiertem Polylysin mit einem Gehalt von 3.8 Mol Mercaptogruppen (photometrische Bestimmung mittels Ellman's Reagens, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) ).

## Transferrin - Polylysin - Konjugate 3:

Die wie oben beschrieben erhaltene Lösung von modifiziertem Transferrin 1 ( 7 ml in 0.1 M  
 35 Natriumphosphat-Puffer pH 7.8 , ca 1.5  $\mu$ mol Transferrin mit ca 2.6  $\mu$ Mol Pyridyldithiopropionat-Resten) wurde mit Argon gespült; es wurden 2.0 ml der oben beschriebenen Lösung von Mercapto-modifiziertem Polylysin 2 (in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5.0, das entspricht ca 0.6  $\mu$ mol PolyLysin mit ca 2.2  $\mu$ mol Mercaptogruppen) zugegeben, mit Argon gespült, geschüttelt und 18 h bei Raumtemperatur in der Dunkelheit und unter Argon reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser auf 14 ml  
 40 verdünnt und durch Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt (Pharmacia Mono S Säule HR 10/10, Gradientenelution, Puffer A : 50 mM HEPES pH 7.9 , Puffer B : A + 3 M Natriumchlorid, 0.5 ml/min). Nichtkonjugiertes Transferrin wurde am Anfang eluiert, Produktfraktionen bei ca 0.66 - 1.5 M Natriumchlorid. Die konjugierten Produkte (Ninhydrinfärbung, in UV bei 280 nm Proteinabsorption, und Fluoreszenz) wurden in 6 Fraktionen mit einem Gehalt von je ca 10 mg Transferrin gesammelt. Die Fraktionen wurden zunächst  
 45 gegen eine 100 mM Eisen(III)citrat-Lösung (mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 7.8 gebracht) dialysiert und danach noch zweimal gegen 1 mM HEPES-Puffer (pH 7.5). Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (10% SDS, 8% Polyacrylamid) zeigte bei Vorbehandlung mit 2-Mercaptoethanol in allen 6 Fraktionen einen ungefähr gleichen Gehalt an Transferrin , während in nicht reduzierten Proben keine Banden für freies Transferrin, sondern nur weniger weit wandernde Konjugate  
 50 sichtbar waren.

## Vorversuch 2

## Transport von Transferrin-Polylysin-Konjugaten in lebende Zellen

Um nachzuweisen, daß die im Vorversuch 1 beschriebenen Transferrin-Polylysin-Konjugate effizient in

lebende Erythroblasten aufgenommen werden, wurden diese Konjugate mit FITC markiert. Es ist bekannt (Schmidt et al., 1986), daß FITC- markiertes Transferrin nach einigen Stunden Inkubation mit Erythroblasten, denen vorher Transferrin entzogen worden war, in Vesikeln innerhalb der Zelle nachweisbar war (Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop).

- 5 Im vorliegenden Beispiel wurden Erythroblasten, (durch ein EGF-Rezeptor-Retrovirus transformiert, Kahazaie et al., 1988) 18 Stunden in transferrinfreiem Differenzierungsmedium (Zusammensetzung in Zenke et al., 1988) bei 37 ° C (Zellkonzentration  $1,5 \times 10^6$ /ml) inkubiert. Nach Zugabe der verschiedenen Transferrin-Polylysin-Konjugate (oder, als Kontrolle, der entsprechenden Menge sterilen aq bidest) wurden die Zellen bei 37 ° C in Gegenwart von 10 ng/ml EGF (um den transformierten Zustand aufrechtzuerhalten) inkubiert.
- 10 Nach 24 und 48 Stunden wurden ca  $5 \times 10^5$  Zellen entnommen, 1 mal in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS; pH 7.2) gewaschen, mit dem 50fachen Volumen einer Mischung von 3.7 % Formaldehyd und 0.02% Glutaraldehyd in PBS fixiert (10 min, 40 ° C), 1 mal in PBS gewaschen, in Elvanol eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Schmalband-FITC und TRITC-Anregung) untersucht. Gleichzeitig wurde in anderen Aliquots der verschiedenen Ansätze die Wachstumsrate der Zellen
- 15 bestimmt. Hierzu wurden 100 µl Zellsuspension entnommen und der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin (8 µCi/ml, 2 Stunden) bestimmt, wie in Leutz et al., 1984 beschrieben. Aus Fig. 10 geht hervor, daß die mit Transferrin-Polylysin inkubierten Erythroblasten nach 24 Stunden 2 bis 10 stark fluoreszierende Vesikel aufweisen, die in den Kontrollen nicht nachweisbar sind. Tabelle A zeigte, daß mit Ausnahme der Fraktion 6 alle Konjugate von praktisch allen Zellen aufgenommen worden sind.
- 20 Die Tatsache, daß die Zellen in allen Proben gleich schnell wachsen (wie durch Einbau von tritiiertem Thymidin ( $^3\text{H}$  TdR) gemessen; Tabelle A), beweist, daß die Zellen durch die Polylysin-Konstrukte nicht geschädigt werden und somit eine unspezifische Aufnahme (z.B. über durchlässig gewordene Zellmembranen) auszuschließen ist.

## 25 Vorversuch 3

- Polylysin-Transferrinkonstrukte können bei der in vitro induzierten Reifung von Hühner-Erythroblasten zu
- 30 Erythrocyten den nativen Transferrin-Eisenkomplex funktionell ersetzen

Ziel dieses Versuches war es zu zeigen, daß die hier verwendeten Transferrin-Polylysin-Konjugate von der Zelle wie natives Transferrin verwendet werden, d.h. den normalen Transferrinzyklus mit ähnlicher Effizienz durchlaufen. Als Testsystem hierfür sind Erythroblasten, die durch "Abschalten" des transformierenden Onkogens zur Ausreifung in normale Erythrocyten induziert werden können, besonders geeignet

35 (Beug et al., 1982). Aus der Literatur geht hervor, daß solche Zellen zur normalen Reifung hohe Konzentrationen an Transferrin-Eisen-Komplex benötigen (100 - 200 µg/ml, 3 fach geringere Konzentrationen verhindern das Ausreifen der Zellen und führen nach mehreren Tagen zum Tod der Zellen (Kowenz et al., 1986). Auch konnte gezeigt werden (Schmidt et al., 1986), daß "recycling", also Wiederverwendung von

40 Transferrinrezeptoren und damit ein mit optimaler Geschwindigkeit ablaufender Transferrinzyklus für eine normale in vitro Differenzierung unerlässlich ist.

Erythroblasten (durch das EGF-Rezeptor-Retrovirus transformiert) wurden durch Entzug von EGF und Zugabe einer optimalen Menge an partiell gereinigtem Hühner-Erythropoietins (Kowenz et al., 1986, frei von Transferrin) zur Differenzierung induziert. Die Inkubation erfolgte bei einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in

45 transferrinfreiem Differenzierungsmedium bei 42 ° C und 5% CO<sub>2</sub>. Bei Inkubationsbeginn wurde entweder nativer Transferrin-Eisen-Komplex (Sigma, 100 µg/ml) oder die mit Eisen gesättigten Transferrin-Polylysin-Konjugate (Konzentration ebenfalls 100 µg/ml) zugegeben. Wachstum und Reifungszustand der Zellen wurden auf folgende Art nach 24 und 48 h analysiert:

1. Bestimmung der Zellzahl (im Coulter Counter, Modell ZM, Beug et al, 1984)
2. Aufnahme von Zell-Größenverteilungen (im Coulter-Channelyzer Mod. 256) und
3. Photometrische Messung des Hämoglobingehalts der Zellen (Kowenz et al., 1986) Außerdem wurden Aliquots der Ansätze nach 72 Stunden in einer Cytozentrifuge (Shandon) auf Objektträger zentrifugiert und einem histochemischen Nachweis für Hämoglobin unterzogen (Färbung mit neutralem Benzidin plus Diff-Quik Schnelfärbung für Blutzellen, Beug et al., 1982).

55 Die Ergebnisse in Tabelle B zeigen deutlich, daß Zellen, die in Gegenwart der Polylysin-Transferrin Konjugate Fraktion 1 bis 5 zur Differenzierung induziert wurden, genauso effizient und mit gleicher Geschwindigkeit ausreifen wie solche, die mit nativem Transferrin-Eisen inkubiert wurden. Die Zellen in den transferrinfreien Kontrollen dagegen zeigten ein stark verlangsamtes Zellwachstum und akkumulierten nur

geringe Mengen an Hämoglobin. Die Untersuchung des Zellphänotyps an gefärbten Cytospin Präparaten ergab, daß die mit Polylysin-Transferrin-Konjugaten inkubierten Zellen genauso zu späten Retikulozyten (late reticulocytes, Beug et al., 1982) herangereift waren wie die mit nativem Transferrin behandelten, während die ohne Transferrin inkubierten Zellen eine Mischung aus desintegrierten und unreifen, erythroblastenähnlichen Zellen darstellten (Schmidt et al., 1986). Nur die mit Transferrin-Polylysin-Fraktion 6 behandelten Zellen wiesen einen geringeren Hämoglobingehalt und einen größeren Prozentsatz an unreifen Zellen auf (Tabelle B). Dies zeigt, daß die mit besonders viel Polylysin konjugierte Fraktion 6 weniger gut im Transferrinzyklus funktioniert. Gleichzeitig weist dieses Ergebnis auf die Empfindlichkeit der Testmethode hin.

#### Vorversuch 4

#### 15 Polylysin-Transferrin-Konjugate ermöglichen die Aufnahme von DNA in Hühnererythroblasten

In vorliegendem Versuch sollte untersucht werden, ob DNA in einer Größe, die der von tDNA-Ribozymen (siehe Beispiel 1) entspricht, von Transferrin-Polylysin-Konjugaten effizient in das Zellinnere transportiert werden kann. Im vorliegenden Beispiel wurde tDNA mit einem Insert der Sequenz

CGTTAACAAGCTAACGTTGAGGGGCATGATATCGGGCC  
CCGGGCAATTGTTGATTGCAACTCCCCGTACTATAGC,

Molekulargewicht ca. 300.000, mit gamma  $^{32}\text{P}$  ATP endmarkiert (Maniatis), verwendet. Ungefähr 0.3  $\mu\text{g}$  dieser DNA, gelöst in 20  $\mu\text{l}$  TE Puffer, wurden entweder mit 10  $\mu\text{g}$  nativem Transferrin, mit 10  $\mu\text{g}$  Transferrin-Polylysin Konjugat Fraktion 3, jeweils gelöst in 50  $\mu\text{l}$  aq bidest plus 400  $\mu\text{g/ml}$  Rinderserumalbumin (Beug et al., 1982) oder mit 50  $\mu\text{l}$  dieses Lösungsmittels ohne Transferrin vermischt. Die DNA-Proteinmischungen wurden zu je 2 ml transferrinfreiem Differenzierungsmedium zugegeben,  $4 \times 10^6$  Hühnererythroblasten, (die mit einem EGF-Rezeptor-Retrovirus transformiert waren und 18 h. in transferrinfreiem Medium in Gegenwart von EGF vorinkubiert wurden, (Kahazie et al., 1988) zugegeben und die Ansätze 8 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen 3 mal in transferrinfreiem Medium gewaschen. Zellsediment und Kulturmedium wurden in 1% SDS, 1mg/ml Proteinase K, 300 mM NaCl, 20mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA (PK/SDS-Puffer) aufgenommen, 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, und die DNA durch Ethanol fällung isoliert. Isolierte DNA mit einer Radioaktivität von insgesamt 2000 cpm wurde auf einem nicht-denaturierenden 3.5 % Acrylamidgel aufgetrennt (TBE, Maniatis) und die DNA durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Fig. zeigt Fluoreszenzaufnahmen von Hühnererythroblasten, die 24 h ohne (A) oder mit FITC-markierten Transferrin-Polylysin-Konjugaten (B,C) inkubiert wurden. Bei Anregung mit blauem Licht (B, zum Nachweis von FITC) sind deutlich mehrere fluoreszierende Vesikel in jeder Zelle zu erkennen. Die Spezifität dieser Fluoreszenz wird dadurch gezeigt, daß die Vesikelfluoreszenz bei Anregung mit grünem Licht (bei welcher eine ähnliche unspezifische Fluoreszenz der Zellen wie in A zu sehen ist) nicht auftritt (C).

Diese Fig. zeigt, daß in der mit Transferrin-Polylysin behandelten Zellprobe etwa 5-10 mal mehr DNA von den Zellen aufgenommen worden ist als in den Kontrollproben mit nativem Transferrin oder ohne Transferrin.

Zwei tRNA-Ribozymgene, gerichtet gegen die Translationsinitiations-Region von erbB wurden konstruiert (vgl. Fig. 2 und 3, Beispiel 1). Ca. 100  $\mu\text{g}$  jedes das Gen enthaltenden Plasmids wurden EcoRI verdaut, um das tRNA-Ribozymgen auf einem 225 bp-Fragment freizusetzen. Die Verdauprodukte wurden mittels Klenow-Fragment endmarkiert und mittels Gelelektrophorese durch ein 2% Agarose/TBE-Gel gereinigt. Das Vektorfragment und die tRNA-Ribozymgen-Fragmente wurden durch Ethidiumbromid-Färbung lokalisiert, ausgeschnitten und durch Elektroelution, Phenol/Chloroform- und Chloroformextraktion und Ethanol fällung gewonnen. Die gereinigten, radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden daraufhin unter Benutzung des Transferrin-Polylysin-Transportsystems dazu verwendet, die Aufnahme und die Hemmung der erbB-RNA zu bestimmen. Als Kontroll-DNA wurde der Vektor pSPT 18 verwendet.

Als Testzellsystem wurde eine Hühnererythroblastenzelllinie gewählt, die durch eine temperatursensitive Mutante (ts 34, Graf et al., 1978) des Vogel-Erythroblastosevirus AEV transformiert ist (Beug et al., 1982

b). (Das in diesen Zellen ebenfalls exprimierte erb A Onkogen kann durch einen spezifischen Proteinkinase-Hemmer (H 7) inhibiert werden. Es wurde festgestellt, daß das v-erbA-Onkogen in vivo und in vitro (d.h. als bakteriell exprimiertes Protein) an zwei Stellen, nämlich Ser 28 und Ser29, durch Proteinkinase C bzw. durch cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert wird. Mutation dieser Serine zu Alaninen verhindert die Phosphorylierung und zerstört die v-erbA-Onkogenaktivität. H7 ist ein spezifischer Inhibitor dieser beiden Kinasen und ist in der Lage, in v-erbA-v-erbB haltigen Erythroblasten selektiv die durch v-erbA verursachten Veränderungen (z.B. Blockierung der Differenzierung) aufzuheben).

Es ist bekannt, daß Erythroblasten, deren erbB Onkogen inaktiviert wird - z.B. durch Erhöhung der Temperatur im Falle einer temperaturempfindlichen erb B Mutante - dazu induziert werden, zu Erythrocyten auszureifen. Eines der ersten Anzeichen für diesen Vorgang ist eine Induktion der Hämoglobinsynthese, die durch einen empfindlichen Nachweis (saure Benzidinfärbung, Orkin et al., 1975, Graf et al., 1978) auf dem Niveau der Einzelzelle nachgewiesen werden kann. Als phänotypische Wirkung eines gegen erb B gerichteten Ribozyms in diesem Testsystem wäre somit eine spezifische Erhöhung der Zahl benzidin-positiver Zellen zu erwarten.

Die diesem Beispiel zugrundeliegende Versuchsreihe wurde folgendermaßen durchgeführt: Die verschiedenen DNA-Präparationen (siehe oben und Tabelle C), gelöst in 30 µl TE-Puffer, wurden mit jeweils 10 µg nativem Transferrin-Eisenkomplex oder Transferrin-Polylysin-Konjugat (gelöst in 50 µl aq. bidest.) gemischt und 30 min bei 37° C inkubiert.

Im Falle der Vektor-DNA (10 µg) wurde entsprechend mehr (100 µg) an Transferrin-Präparationen verwendet. Die DNA-Transferrin-DNA-Mischungen wurden zu je 1 ml transferrinfreiem Differenzierungsmedium (Zenke et al., 1988) zugegeben. Die Testzellen (pro Ansatz 3x10<sup>5</sup>) wurden vor dem Versuch 60 min in transferrinfreiem Differenzierungsmedium bei 42° C inkubiert, (hierdurch wird die Transferrinaufnahme verstärkt) und zu den DNA-Transferrin-haltigen Ansätzen hinzugegeben. Nach 6 h, 18 h und 68 Stunden (Behandlung der Zellen siehe unten) wurden Proben entnommen, wie beschrieben, in Überstand und Zellsediment aufgetrennt, in PK/SDS Puffer aufgenommen und die DNA analysiert (Fig. 9).

Nach Inkubationsende (6 h) wurden die Zellen abzentrifugiert und in transferrinhaltigem Differenzierungsmedium mit Erythropoietin und Insulin (Kowenz et al., 1986, Zenke et al., 1988), 2 ml pro Ansatz und bei 37° C d.h. in Anwesenheit eines aktiven v-erb B-Proteins) weitere 72 h inkubiert.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Ähnlich wie in Vorversuch 4 konnte eine verstärkte Aufnahme von DNA in der Größe der erbschnitt DNA's in den mit Transferrin-Polylysin behandelten Zellproben (etwa 5 fach) beobachtet werden.

2. Durch Transfektion von Hühnerfibroblasten mit erbschnitt DNA konnte gezeigt werden, daß die erbschnitt-Ribozym-tDNA in Hühnerzellen exprimiert wird (siehe Beispiel 5).

3. Tabelle C zeigt, dass in allen Fällen, in denen erbschnitt-Ribozym-tDNA mit Hilfe von Polylysin-Transferrin-Konstrukten in erb B transformierte Erythroblasten eingebracht wurde, der Prozentsatz an benzidin-positiven Zellen signifikant (auf ca. das Doppelte) erhöht war (als Referenz dienten die Proben, die mit Vektor-DNA behandelt wurden und in denen die Verwendung von Polylysin-Transferrin-Konjugaten erwartungsgemäß nicht zu einer Erhöhung der Zahl benzidin-positiver Zellen führte).

#### Beispiel 7

Verlängerung der Anticodon-Stammregion erhöht die Ausbeute an ribtRNA

Das humane met tRNA-Gen (kloniert als BamHI/RsaI Fragment, ergänzt durch EcoRI Linker, in die EcoRI Schnittstelle des Bluescript-Vektors) wurde an seiner einzigen ApaI-Schnittstelle in der Anticodonstammregion gespalten. Die einzelsträngigen Überhänge wurden durch T4-DNA-Polymerasebehandlung entfernt und Oligonukleotide, enthaltend die Ribozymsequenzen, inseriert. Die in den vorangegangenen Beispielen verwendete Ribozyminsertion resultierte in einem ribtRNA-Molekül, enthaltend einen 3-Basen-Stamm (Fig. 11 zeigt die Wildtyp-tRNAm<sup>et</sup> und die tRNA<sup>rib</sup> mit dem verkürzten Anticodon-Stamm). Bei der zweiten Konstruktion wurde ein Oligonukleotid, das sich vom ersten durch die zur Wildtypsequenz komplementäre Sequenz GGTTAT am 5' Ende unterschied, verwendet. Dabei wurde der Wildtypstamm wiederhergestellt und durch 4 zusätzliche Basenpaare verlängert (Fig. 12 zeigt die Konstruktion der tRNA<sup>rib</sup> mit dem verstärkten Anticodon-Stamm. Die Sequenz der Ribozyme ist in Fig. 13 dargestellt; am linken (5') Ende sind die Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen der für den verkürzten Stamm und den verstärkten Stamm kodierenden Region gekennzeichnet. In Fig. 13 ist weiters die Sequenz des met tRNA-Gens wiedergegeben). Die beiden Ligationsprodukte wurden nach der in Maniatis beschriebenen Standard-

methode in E.coli HB 101 transformiert, geeignete Klone wurden ausgewählt, die Plasmid DNA isoliert und zur Bestimmung der richtigen Struktur sequenziert. Die beiden resultierenden ribtRNA-Gene wurden durch Mikroinjektion der klonierten DNA in *Xenopus* Oozyten, durchgeführt wie in Beispiel 2 bzw. 3 beschrieben, in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -GTP auf Transkriptionsaktivität und Akkumulierung der ribtRNA-Moleküle untersucht.

- 5 Das Wildtyp-tRNA-Gen wurde bei 10fach niedrigerer Konzentration coinjiziert. Die injizierten Oozyten wurden 7 h lang bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert, die resultierende RNA wurde geerntet (vgl. Beispiel 2) und elektrophoretisch aufgetrennt (10 % Acrylamid/8,3 M Harnstoff/TBE-Gel) und die RNA-Moleküle durch Autoradiographie (2 Tage exponiert bei  $-70^\circ\text{C}$ ) sichtbar gemacht (Fig. 14). Das verkürzte ribtRNA-Ge liefert ca. 1/10 der RNA-Menge, die vom Wildtyp-Gen transkribiert wird, im Vergleich dazu liefert das Gen, das für das ribtRNA-Molekül mit dem verlängerten Stamm kodiert, die 6fache Menge an RNA.

#### Beispiel 8

15

#### Expression von Ribozymgenen als Bestandteil von Introns

Als Ausgangsgen wurde ein *Xenopus laevis* tRNA<sup>tyr</sup>-C-Gen (Oocyten-Typ) gewählt, welches ein 13 Nukleotide umfassendes Intron enthält. Die natürliche Intron-Sequenz wurde wie folgt modifiziert: Erstens wurde eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingefügt (ApaI; GGGCCC), um eine nachfolgende Klonierung von Oligonukleotiden zu ermöglichen, zweitens komplementäre Nukleotide zum Anticodon-Triplett, um durch Verlängerung der Intronsequenz über ein zusätzlich stabilisierendes Strukturmerkmal zu verfügen. Die Größe des Introns im modifizierten Gen ist von 13 Nukleotide auf 15 Nukleotide erhöht (Fig. 15).

- Die Modifizierung der Intronsequenz wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase chain reaction" PCR; Ho et al., 1989) durchgeführt. Dafür wurden vier Primer synthetisiert, von denen zwei die geänderte Intronsequenz (zueinander komplementär) enthielten und zwei gegen das 5'- bzw. das 3'-Ende des Gens gerichtet waren, um eine EcoRI bzw. Sall Restriktionsschnittstelle einzuführen. Das Wildtyp-Gen lag als HhaI-Fragment (258 bp), kloniert in pBR327, vor (Stutz et al. 1989). Das resultierende PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt, mit den genannten Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem Vektor pAALM (= pSP64 + T7 Promotor; Vieira und Messing, 1982) ligiert. Das Konstrukt wurde in E.coli HB 101 transformiert und Klone, enthaltend das gewünschte Insert, durch Sequenzanalyse identifiziert.

- Die Aktivität des modifizierten Gens (tRNA<sup>tyr</sup>-M) wurde mit der des Wildtyp-Gens durch Mikroinjektion in *Xenopus* Oocyten verglichen, wobei als interner Standard ein 5S-RNA-Gen (50 fach niedrigere Konzentration), das auf dem Plasmid pUC-10-5S vorlag (Carroll und Brown, 1976) in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -GTP coinjiziert wurde. Die injizierten Oocyten wurden 20 Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert, die RNA auf einem 8% Acrylamid/8,3 M Harnstoff/TBE-Gel aufgetrennt und autoradiografiert (Fig. 16). Sichtbar werden neben der 5S-RNA bei 120 nt das primäre tRNA<sup>tyr</sup>-Transkript bei 100 (102) nt, die 5'- und 3'-prozessierte Precursorform bei 90 (92) nt, sowie die fertig prozessierte Tyrosin tRNA bei 76 nt. Das Spleißen der 90 nt Precursorform erscheint als der limitierende Faktor, sodaß der Großteil des gebildeten Transkripts (ca. 80 %) in dieser Form vorliegt. Wie erwartet, wurde die biologische Aktivität durch die Modifikation gegenüber dem Wildtyp-Gen nicht vermindert.

- In einem weiteren Experiment wurde die Leistungsfähigkeit des Systems getestet. Es wurden zwei Ribozymsequenzen enthaltende Oligodeoxyribonukleotide synthetisiert, die bereits ApaI-Enden enthalten und somit direkt in die Intronsequenz des modifizierten tRNA<sup>tyr</sup>-Gens kloniert werden konnten. Bei einem Oligonukleotid wurden an beiden Enden 12 nt eingefügt, um in Ribintrons stabile "hairpins" zu bilden und damit Exonukleaseabbau entgegenzuwirken. Die Gesamtgröße des daraus resultierenden Introns betrug 89 nt (Ribozym HP) gegenüber 65 nt im Falle der ungeschützten Ribozymsequenz (Ribozym C). Die Sequenzen der Ribozyme sowie das Klonierungsschema sind in Fig. 17 dargestellt.

- Für die analog zu den oben beschriebenen Mikroinjektionen in *Xenopus* Oocyten wurde neben den beiden beschriebenen Konstrukten ein drittes verwendet, welches das Ribozym HP in dimerer Form enthält und so die Introngröße auf 163 nt erhöht (Ribozym D). Die Konzentration des coinjizierten 5S-Standards betrug 1 : 20 bei den Konstrukten HP und D, 1 : 1 bei Konstrukt C (Fig. 18). Das Experiment zeigt, daß die Konstrukte HP und C trotz wesentlich vergrößerter Introns sehr aktiv transkribiert und mit gleicher Effizienz prozessiert werden wie das Wildtyp tRNA<sup>tyr</sup>-Gen. Im Falle des Konstrukts D ist nur eine minimale Menge Transkript nachweisbar, weil offensichtlich die für die Bildung eines Pol III -Transkriptionskomplexes notwendige Sekundärstruktur durch die lange Intronsequenz zerstört wurde.

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von Ribozymen als Introns von tRNAs zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der tRNA-Sekundärstruktur führt, wodurch das entstehende Transkript in



hoher Konzentration akkumuliert und korrekt prozessiert werden kann.

Tabelle A

Transport von PolyLysin-Transferrin in Erythroblasten					
Ansatz	Medium	Transferrin-polyLysin	Vesikelfluoreszenz		Viabilität (3H Td R-Einbau)
			24 h	48 h	48 h
1	2 ml	ohne Zusatz	<1 %	<1 %	140.000 cpm
2	2 ml	145 µl H <sub>2</sub> O	<1 %	<1 %	126.000 cpm
3	2 ml	145 µl TfpL Fr1	>90 % **	>90 % **	137.000 cpm
4	2 ml	145 µl TfpL Fr2	>90 % ***	>90 % ***	161.000 cpm
5	2 ml	145 µl TfpL Fr3	>90 % ***	>90 % ***	153.000 cpm
6	2 ml	145 µl TfpL Fr4	ca.80 % ***	>90 % ***	151.000 cpm
7	2 ml	145 µl TfpL Fr5	ca.60 % ***	>90 % ***	153.000 cpm
8	2 ml	145 µl TfpL Fr6	ca.40 % ***	>90 % ***	165.000 cpm

+ + und + + + bezeichnen die relative Stärke der Vesikelfluoreszenz

Tabelle B

PolyLysin-Transferrin kann bei der Stimulierung der in-vitro induzierten Reifung von Erythroblasten normales Transferrin funktionell ersetzen							
Nr.	Medium	Zusatz <sup>b</sup>	Zellzahl		Hämoglobin		Reifungsgrad
			(x 10 <sup>6</sup> /ml)		E 492		% Reticulozyten
			24 h	48 h	24 h	48 h	72 h
1	2 ml	Fe-Transferrin	3,28	4,38	1,38	2,74	>80 %
2	2 ml	-	2,62	2,56	0,35	0,23	<1 %
3	2 ml	H <sub>2</sub> O	2,60	2,42	0,30	0,13	<1 %
4	2 ml	TfpL Fr1	3,70	4,44	1,36	2,69	>80 %
5	2 ml	TfpL Fr2	3,56	4,24	1,16	2,51	n.b. <sup>a</sup>
6	2 ml	TfpL Fr3	3,72	4,54	1,58	2,54	>80 %
7	2 ml	TfpL Fr4	3,48	4,56	1,57	2,55	n.b.
8	2 ml	TfpL Fr5	3,36	4,26	1,41	2,47	n.b.
9	2 ml	TfpL Fr6	3,58	4,4	1,14	1,93	60-65 %

<sup>a</sup>: nicht bestimmt

<sup>b</sup>: Fe-Transferrin, 200 µg in 13 µl; TfpL-Fraktionen, 200 µg in 130 µl; H<sub>2</sub>O, 130 µl

Tabelle C

Reifung (Hämoglobingehalt) von v-erbB - transformierten Erythroblasten, die v-erbB - Ribozym - DNA aufgenommen haben							
Nr.	DNA			Transferrin		Hämoglobin-Gehalt (% positiv nach saurer Benzidinfärbung)	
	Art	MW	Menge	Art	Menge	14 h	62 h
1	erbschnitt 13	2x10 <sup>5</sup>	1 µg	Tf	10 µg	<1	15 + -3 <sup>a</sup> (3) <sup>b</sup>
2	erbschnitt 13			TfpL Fr5	10 µg	<1	37 + -4 (2)
3	erbschnitt 53	2x10 <sup>5</sup>	1 µg	Tf	10 µg	<1	25 + -2 (2)
4	erbschnitt 53			TfpL Fr5	10 µg	<1	42 + -1 (2)
5	vector ohne Ribozym	2x10 <sup>5</sup>	10 µg	Tf	100 µg	<1	23 + -3 (2)
6	vector ohne Ribozym		10 µg	TfpL Fr5	100 µg	<1	22 + -2 (2)
7	erbschnitt 13 + 53	s.o.	0,5 + 0,5 µg	Tf	10 µg	<1	21 + -2 (2)
8	erbschnitt 13 + 53		0,5 + 0,5 µg	TfpL Fr5	10 µg	<1	38 + -2 (2)

a: Pro Bestimmung wurden > 200 Zellen ausgezählt, Werte + - Standardabweichung

b: Anzahl unabhängiger Bestimmungen

## Literatur:

- Altmann et al. (1988), Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles, Herausgeber Birnstiel, Springer Verlag, Berlin, 183-195
- Beug et al. (1982a), J.Cell Physiol. Suppl.1, 195-207
- Beug et al. (1982b), Cell 28, 907-919
- Beug et al. (1984), Cell 36, 963-972
- Caroll and Brown, (1976), Cell 7, 477-486
- Ciliberto et al. (1982), Proc.Natl.Acad.Sci.79, 1921-1925
- Clarkson, Eukaryotic Genes, Their Structure, Activity and Regulation, Herausgeber: McLean et al., Butterworth (1983), 239-261
- Cotten et al. (1988), EMBO J., 7, 801-808
- Felgner et al. (1987), Proc.Natl.Acad.Sci. 84, 7413-7417
- Folk et al. (1983), Cell 33, 585-593
- Fromm et al. (1987), Methods in Enzymol. 153, 351-366
- Geiduschek et al. (1988), Ann.Rev.Biochem. 57, 873-914
- Graf et al. (1978), Nature 275, 496-501
- Graham et al. (1973), Virology 52, 456-467
- Hampel u.Tritz (1989), Biochemistry 28, 4929-4933
- Haseloff et al. (1988), Nature 334, 585-591
- Ho et al. (1989), Gene 77, 51-59
- Hofstetter et al. (1981), Cell 24, 573-585
- Jennings et al. (1987), EMBO J. Vol.6, 10, 3043-3047
- Jung et al. (1981), Biochem.Res.Comm.101, 599
- Kahazaie et al. (1988), EMBO J. 10, 3061-3071
- Kowenz et al. (1986), Mod.Trends in Human Leukemia VII, Springer Verlag, 199-209
- Kressmann et al. (1978), Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 1176-1180
- Kressmann et al. (1980), Series 31, 383-407
- Kuo et al. (1988), J.Virol. 62, 4439-4444
- Langridge et al. (1987), Methods Enzymol. 153, 336-351
- Leutz et al. (1984), EMBO J. 3, 3191-3197

Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor  
 Melton et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056  
 Mowry et al. (1987), Science 238, 1682-1687  
 Orkin et al. (1975), Proc.Natl.Acad.Sci. 72, 98-102  
 5 Pepperkok et al. (1988), Proc.Natl.Acad.Sci.85, 6748-6752  
 Schmidt et al. (1986), Cell 46, 41-51  
 Sharmeen et al. (1988), J.Virol.62, 2674-2679  
 Soldati et al. (1988), Mol.Cell.Biol.8, 1518-1524  
 Stewart et al. (1987), EMBO J.6, 383-388  
 10 Stutz et al. (1989), Genes & Development Vol.3, 8, 1190-1198  
 Telford et al. (1979), Proc.Acad.Sci. 76, 2590-2594  
 Uhlenbeck et al. (1987), Nature 328, 596-600  
 Vennstrom et al. (1980), J.Virol. 36, 575-585  
 Viera und Messing, (1982), Gene 19, 259-268  
 15 Wu et al. (1989), Proc.Natl.Acad.Sci. 86, 1831-1835  
 Zasloff et al. (1982), Nature 300, 81-84  
 Zasloff et al. (1983), Proc.Acad.Sci. 80, 6426-6440  
 Zenke et al. (1988), Cell 52, 107-119

## 20 Ansprüche

1. Genetische Einheit, gegebenenfalls in Mehrfachkopie vorliegend, dadurch gekennzeichnet, da sie die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten und eine für RNA inhibierende RNA kodierende DNA enthält, die innerhalb der genetischen Einheit derart angeordnet ist, daß die inhibierende RNA Teil des Polymerase III-Transkripts ist.
2. Genetische Einheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende RNA ein Ribozym ist.
3. Genetische Einheit nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ribozym ein Ribozym vom "hammerhead"-Typ ist.
4. Genetische Einheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende RNA eine Antisense RNA ist.
5. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Transkriptionseinheiten eines tDNA-Gens enthält.
- 35 6. Genetische Einheit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Transkriptionseinheiten einer Initiations-Met tDNA enthält.
7. Genetische Einheit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Transkriptionseinheiten einer tyrDNA enthält.
8. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für die inhibierende RNA kodierende DNA als Insert zwischen dem A-Block und dem B-Block des von Polymerase III transkribierten Gens enthält.
- 40 9. Genetische Einheit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende RNA ein Ribozym ist.
10. Genetische Einheit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Ribozym ein Ribozym vom "hammerhead"-Typ ist.
11. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 6, 8, 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für inhibierende RNA kodierende DNA als Insert in der natürlichen Apal-Restriktionschnittstelle zwischen A- und B-Block enthält.
12. Genetische Einheit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für die inhibierende RNA kodierende Oligonukleotidsequenz als Bestandteil des Introns enthält.
- 50 13. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Oligonukleotidsequenz derart enthält, daß die Anticodon-Stammregion des tRNA-Transkripts gegenüber der des Wildtyp-tRNA-Transkripts verlängert ist.
14. Genetische Einheit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine für ein Ribozym kodierende DNA enthält.
- 55 15. Genetische Einheit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Ribozym ein Ribozym vom "hammerhead"-Typ ist.
16. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für

die inhibierende RNA kodierende DNA als Insert in einer künstlich eingeführten Restriktionsschnittstelle enthält.

17. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Intron derart modifiziert ist, daß die Sekundärstruktur der Precursor-tRNA stabilisiert wird, wobei die für das Splicing maßgeblichen Strukturen erhalten bleiben.

18. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende RNA gegen virale RNA gerichtet ist.

19. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende RNA gegen Oncogene oder andere Schlüsselgene, die Wachstum und/oder Differenzierung von Zellen kontrollieren, gerichtet ist.

20. Genetische Einheit nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Mehrfachkopie vorliegt, wobei gleiche oder verschiedene für inhibierende RNA kodierende DNA enthaltende Untereinheiten als komplette Transkriptionseinheiten vorliegen.

21. Verfahren zum Einführen der genetischen Einheiten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 in die Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß die genetischen Einheiten derart modifiziert werden, daß ihre Aufnahme in die Zelle durch Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die genetischen Einheiten mit einem Transferrin-Polykation-Konjugat komplexiert und die Zellen mit diesem Komplex in Berührung gebracht werden.

23. Verwendung der in einem der Ansprüche 1 bis 20 definierten genetischen Einheiten zur Inhibierung von RNA in vivo.

24. Verwendung nach Anspruch 23 zur Inhibierung von Oncogenen oder anderen Schlüsselgenen, die Wachstum und/oder Differenzierung von Zellen kontrollieren.

25. Verwendung nach Anspruch 23 zur Inhibierung von pathogenen Viren.

26. Verwendung nach Anspruch 23 zur Herstellung transgener Tiere, in denen die genetische Einheit konstitutiv transkribiert wird.

27. Verwendung nach Anspruch 23 zur Herstellung transgener Pflanzen, in denen die genetische Einheit konstitutiv exprimiert wird.

28. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend als wirksame Komponente eine oder mehrere genetische Einheiten nach einem der Ansprüche 1 bis 20.

29. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 28 zur Inhibierung viraler RNA.

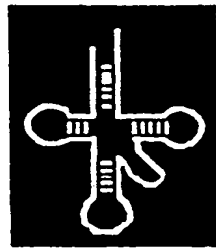
30. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 28 zur Inhibierung von Oncogenen oder anderen Schlüsselgenen, die die Wachstumsrate von Zellen kontrollieren.

31. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 28 zur Inhibierung der Synthese unerwünschter Genprodukte.

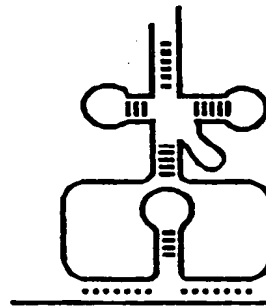
32. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein Transferrin-Polykation-Konjugat, das zur Komplexierung der genetischen Einheit befähigt ist, enthält.

33. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Transferrin-Polylysin-Konjugat enthält.

34. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Transferrin-Protamin-Konjugat enthält.



tRNA-Molekül



tRNA-Ribozym-Modell

Komplementärsequenzen zur  
Ziel-RNA

Spaltstelle

FIG. 1.

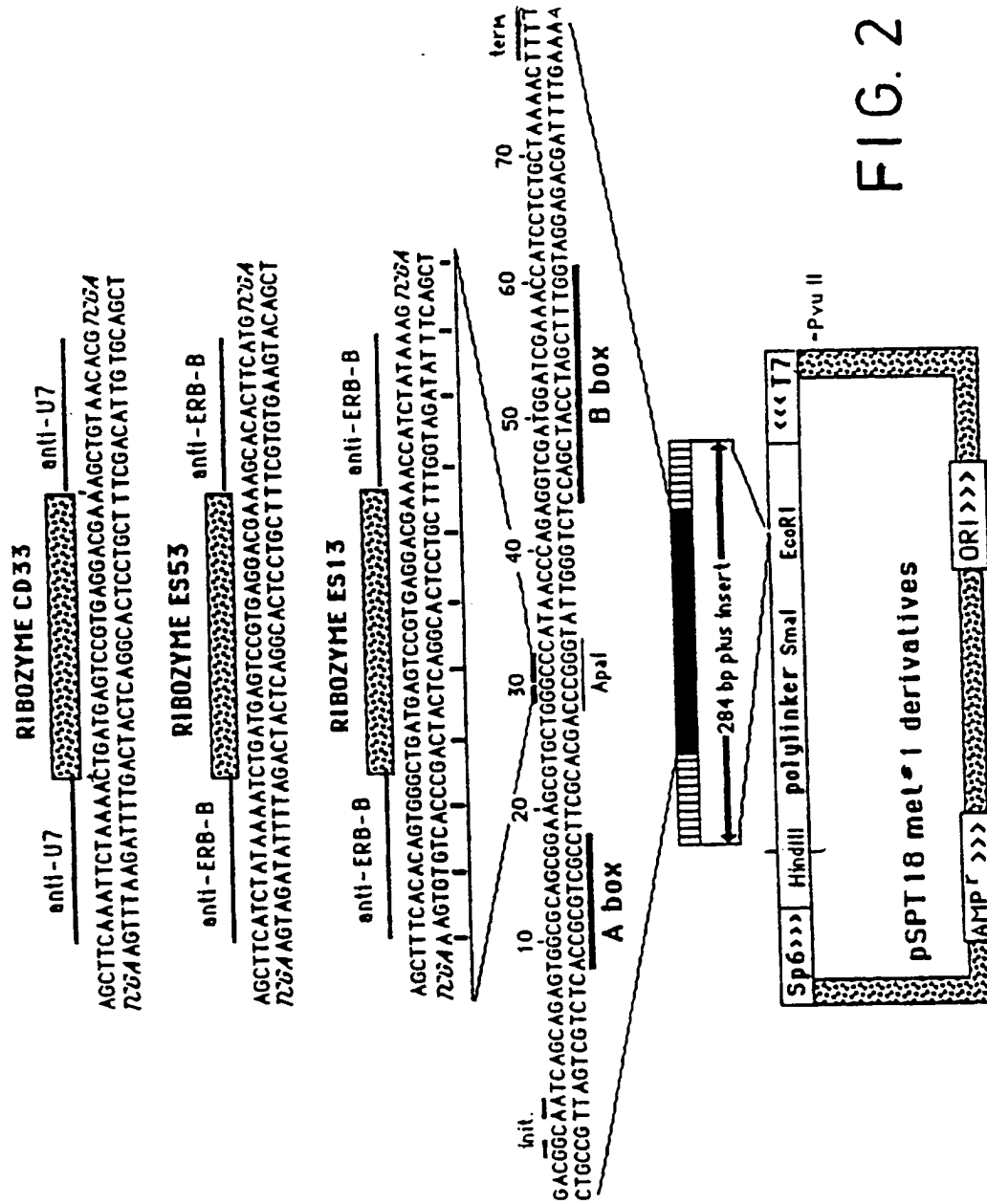


FIG. 2.

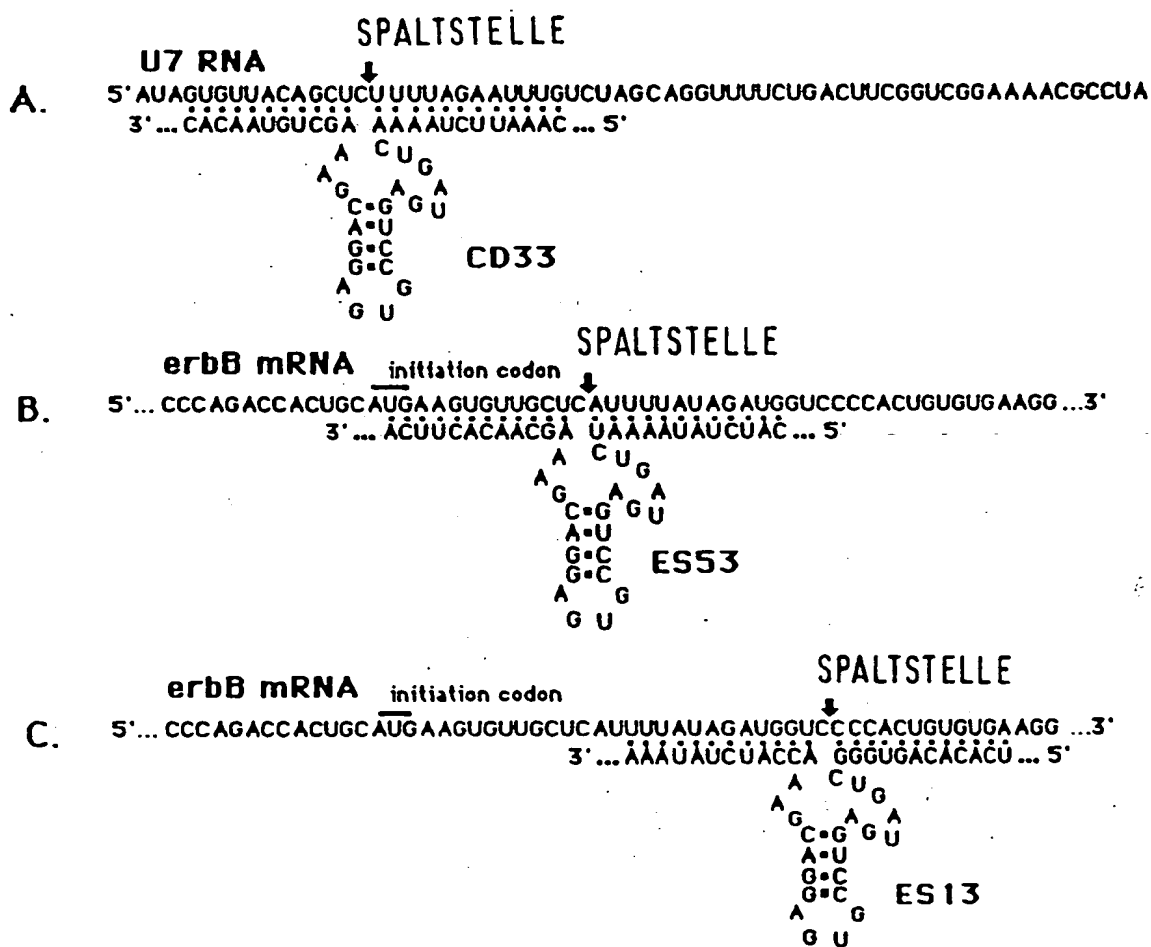


FIG. 3.

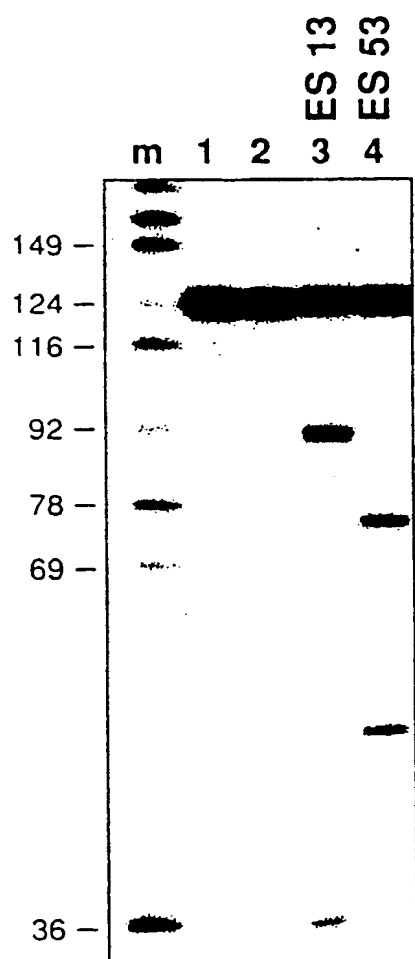


FIG. 4.

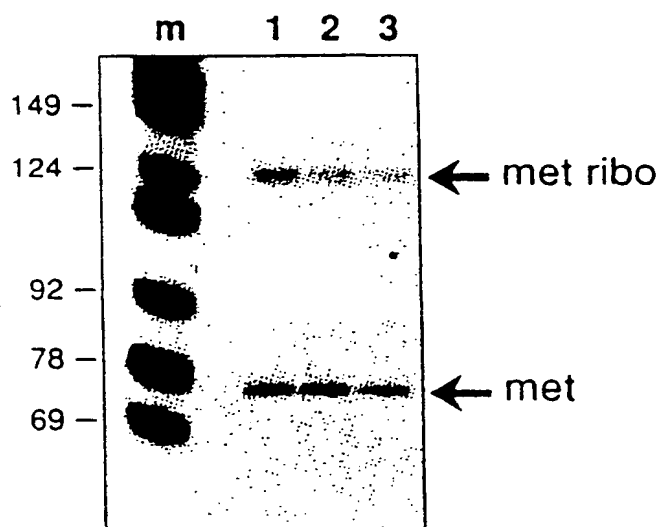


FIG. 5.



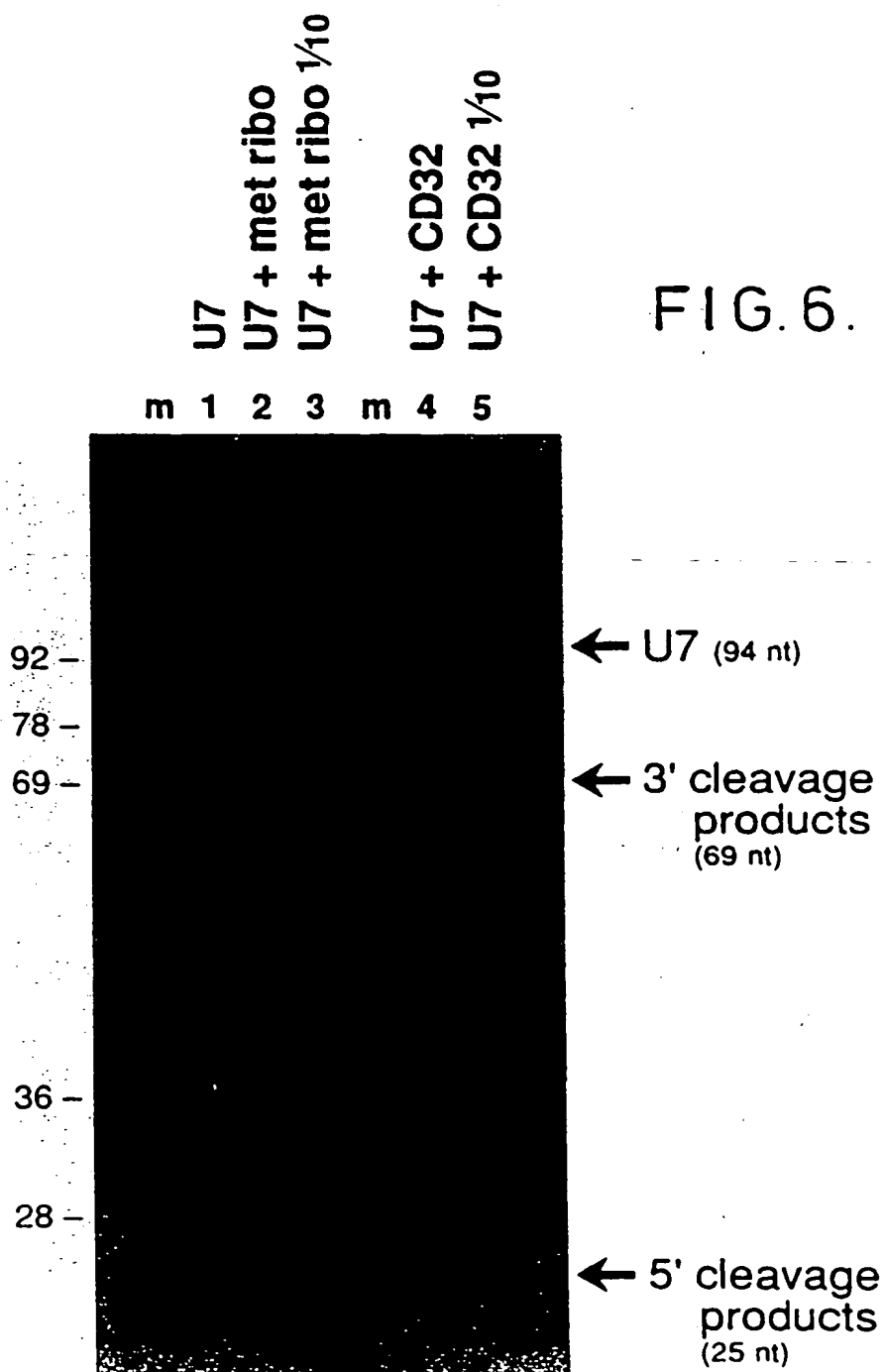
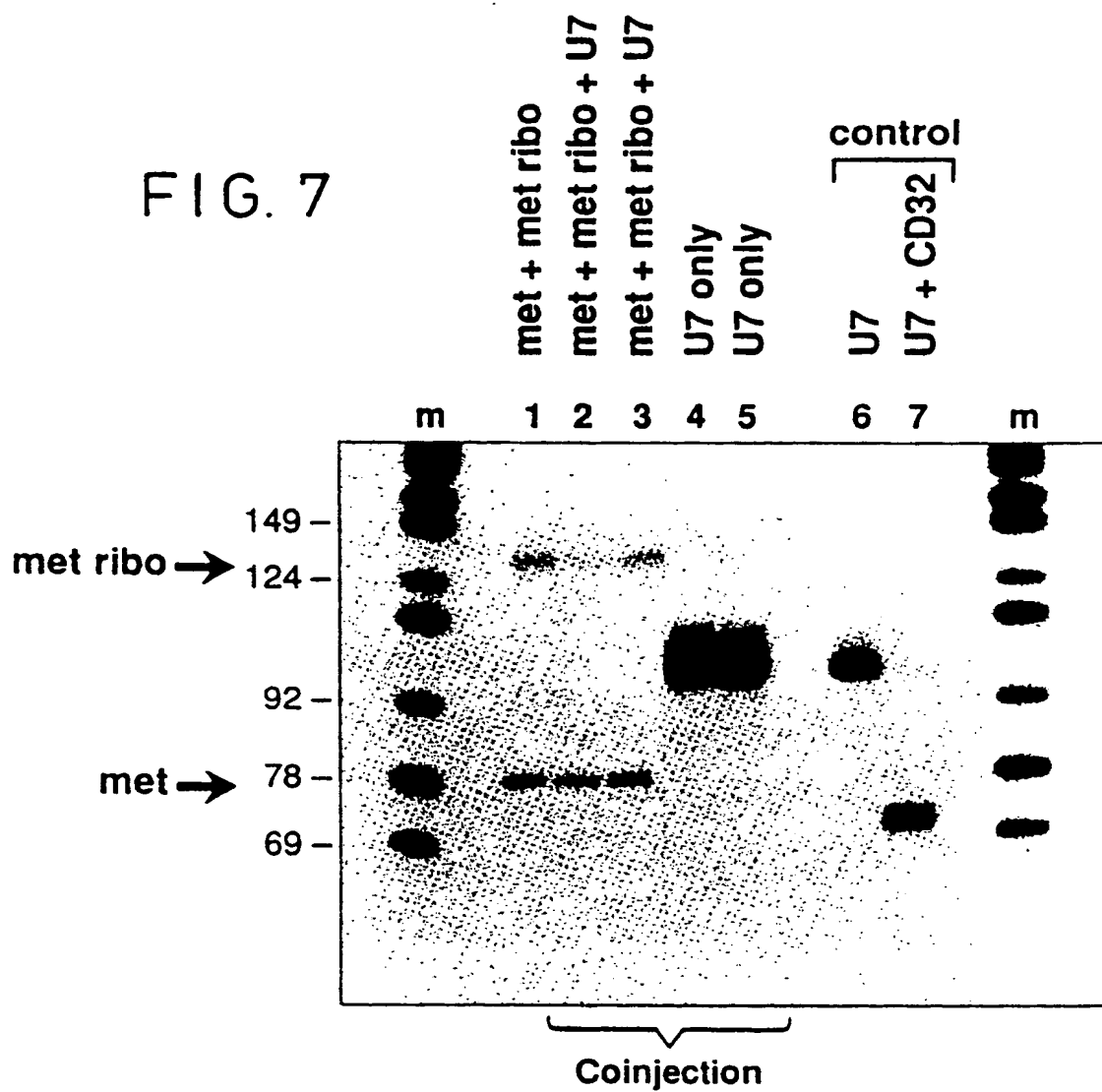


FIG. 6.

FIG. 7



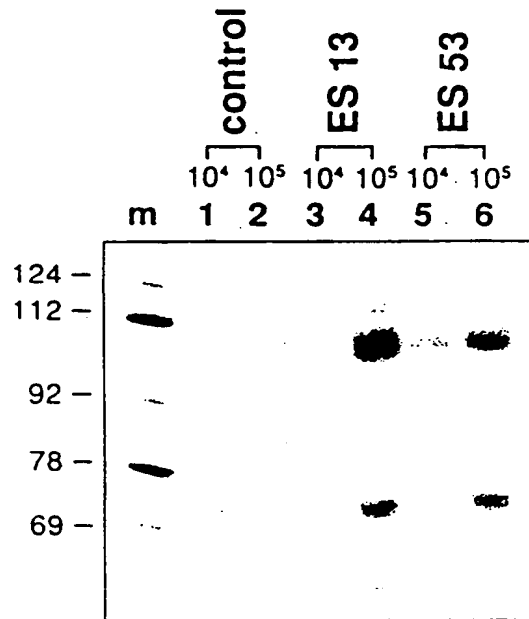


FIG. 8.

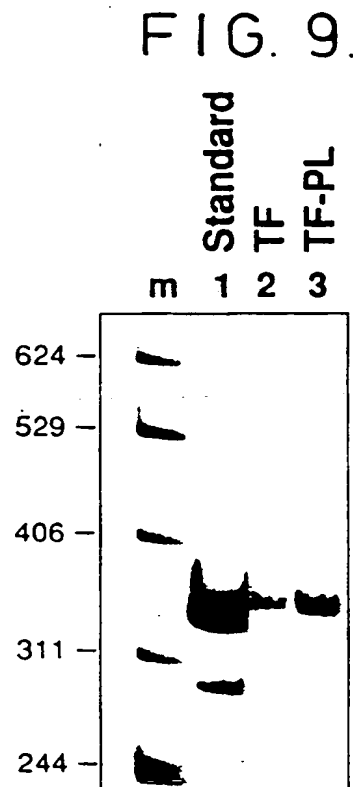
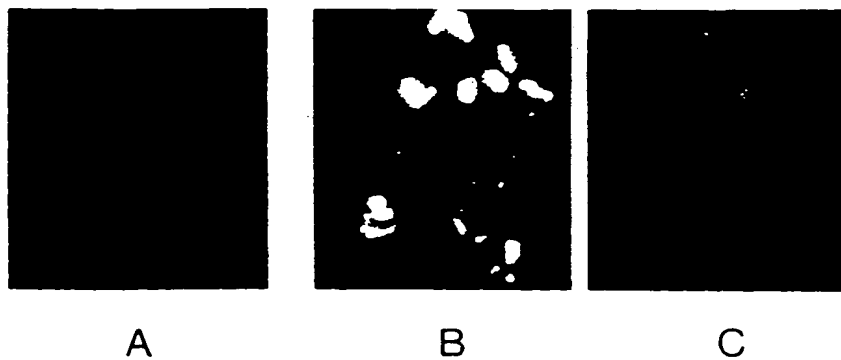


FIG. 9.

FIG. 10.



tRNA<sup>met</sup>

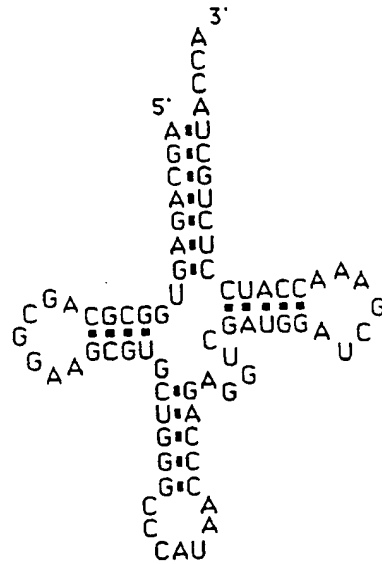
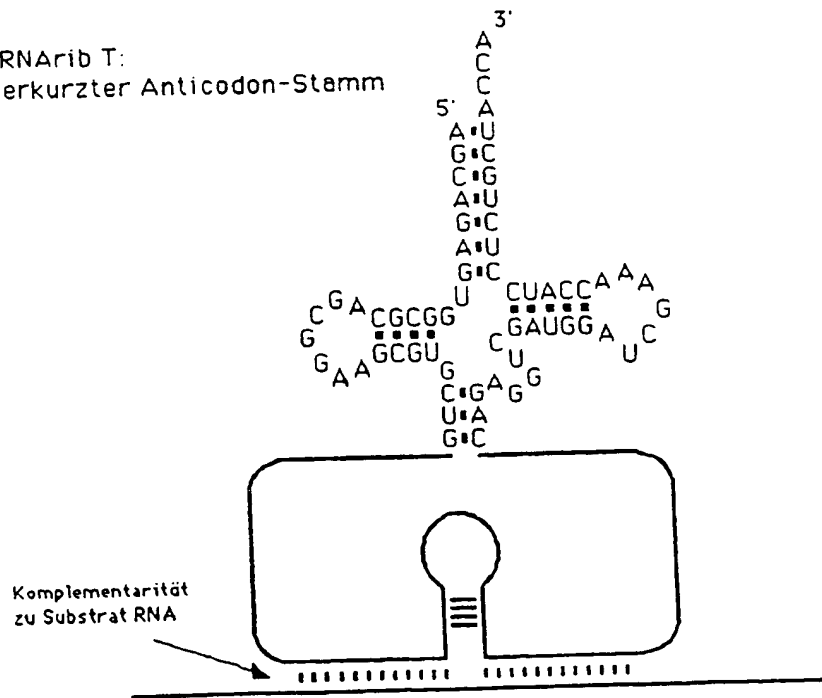


FIG. 11.

tRNA<sup>rib T</sup>:  
verkürzter Anticodon-Stamm



tRNA<sup>met</sup>

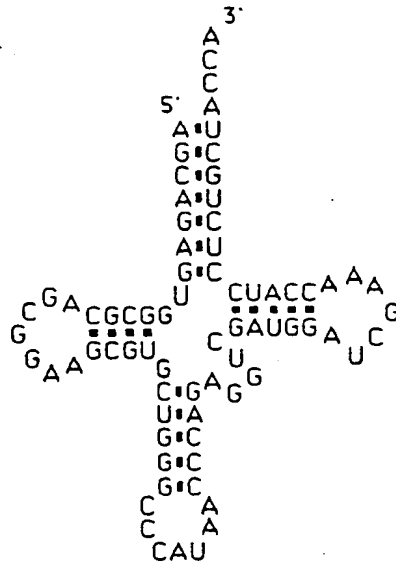
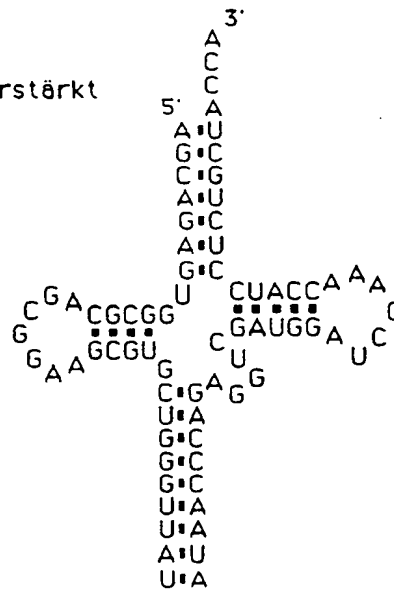
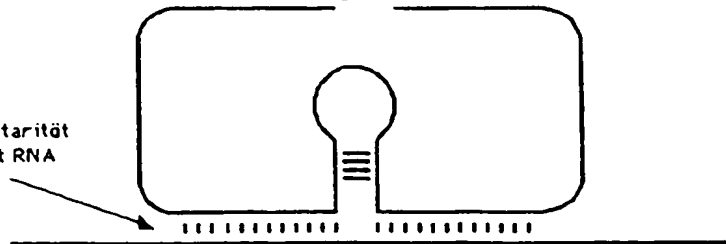


FIG. 12.

tRNA<sup>rib R</sup>:  
Anticodon-Stamm verstärkt



Komplementarität  
zu Substrat RNA



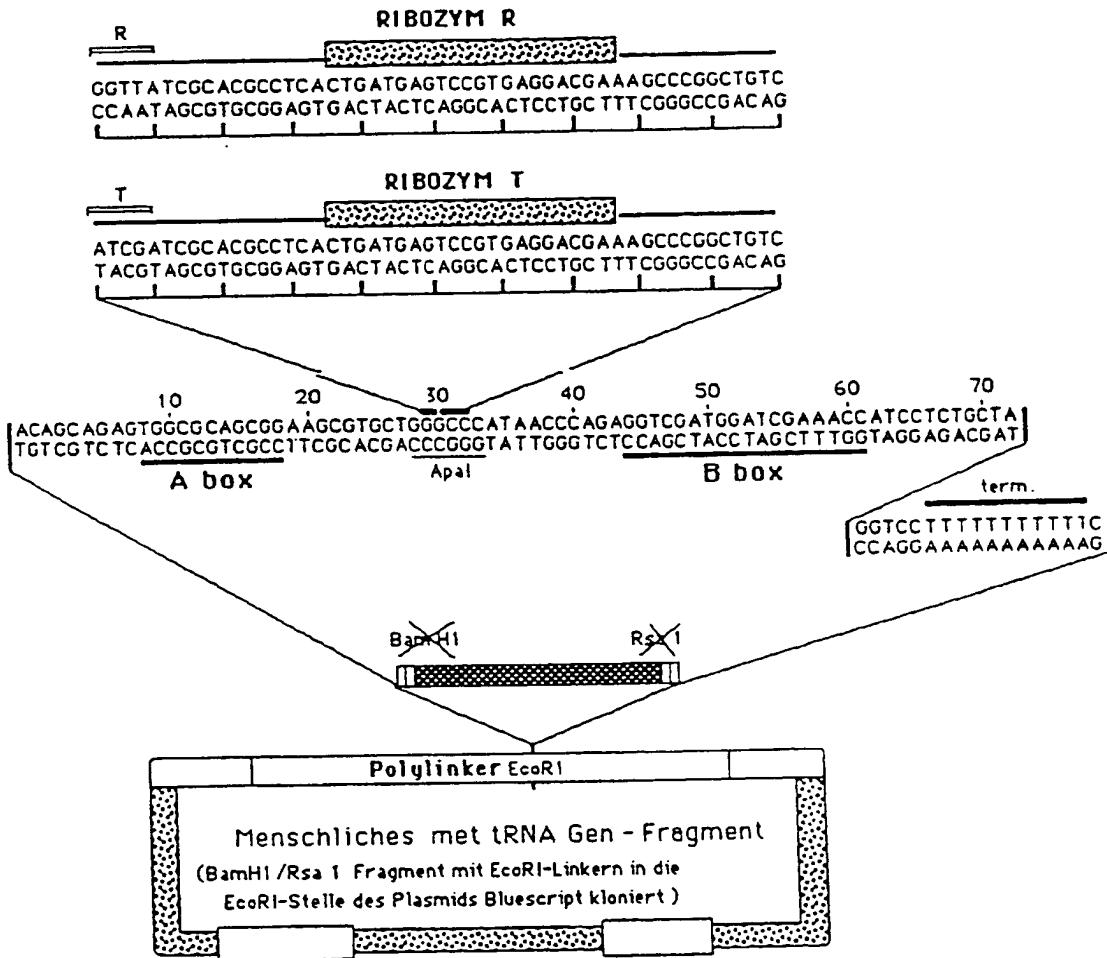


FIG. 13.

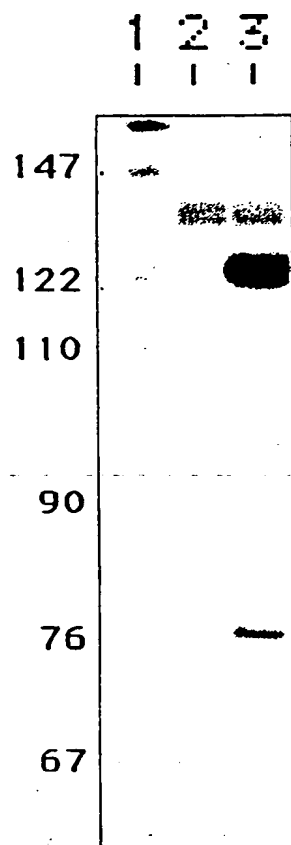
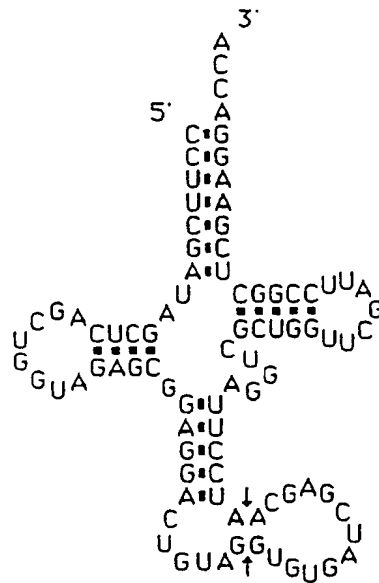


FIG. 14.

Bahn 1: Molekulargewichtsmarker

Bahn 2: RibtRNA T ( verkürzter Anticodonstamm ) +  
tRNAm<sup>et</sup> ( Inj. Konz. 10:1 )

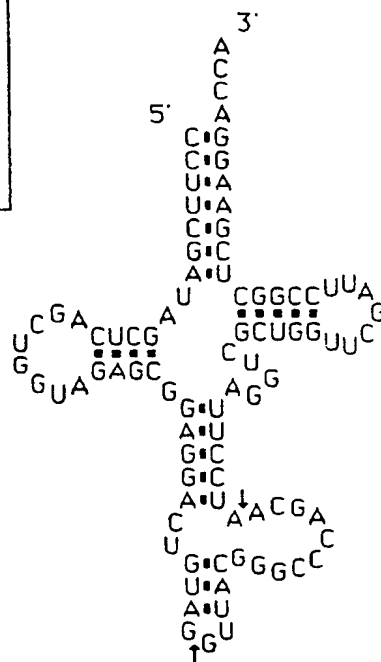
Bahn 3: RibtRNA R ( verlängerter Anticodonstamm ) +  
tRNAm<sup>et</sup> ( Inj. Konz. 10:1 )



**tRNA<sup>tyrC</sup>**  
Xenopus laevis  
Oocyten-Typ

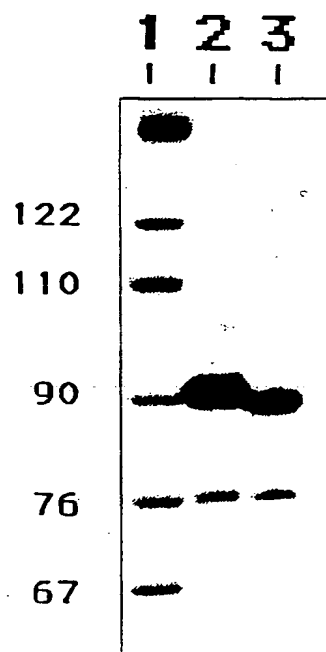
FIG. 15.

**tRNA<sup>tyrM</sup>**  
modifiziertes Intron:  
Komplementarität zu  
Anticodon Triplett und  
Apel - Restriktions-  
schnittstelle



↑ Spleißstelle





Bahn 1: Molekulargewichtsmarker  
 Bahn 2: tRNA<sup>tyrM</sup> + 5S RNA ( Inj. Konz. 50:1 )  
 Bahn 3: tRNA<sup>tyrC</sup> + 5S RNA ( Inj. Konz. 50:1 )

FIG. 16.

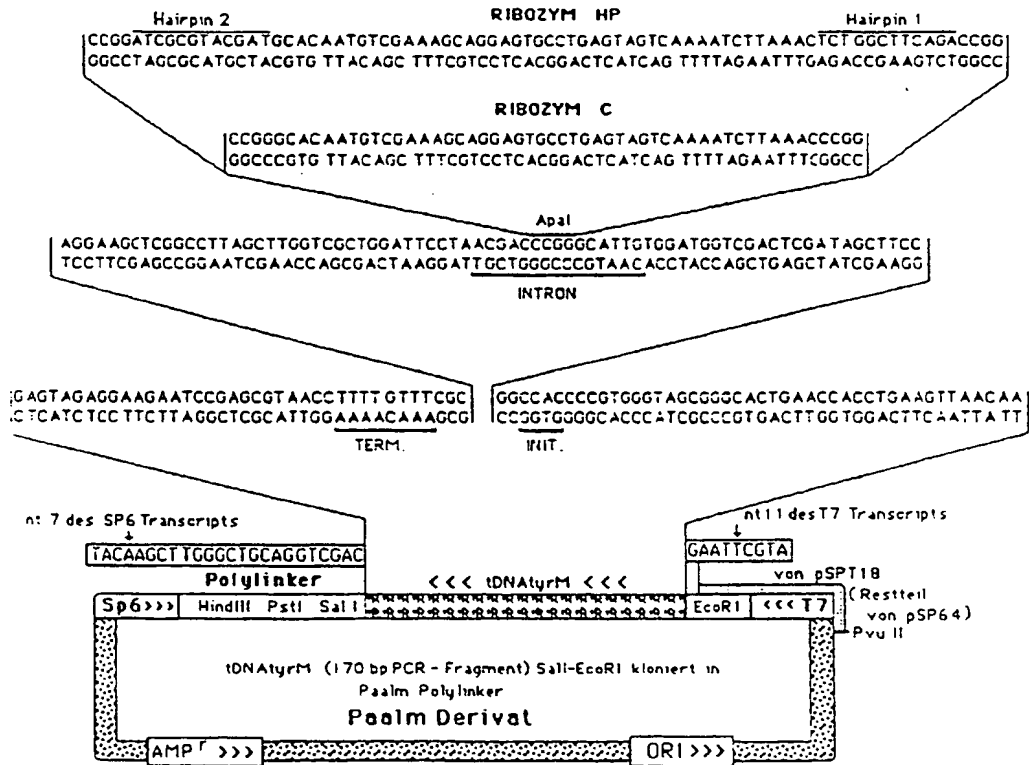
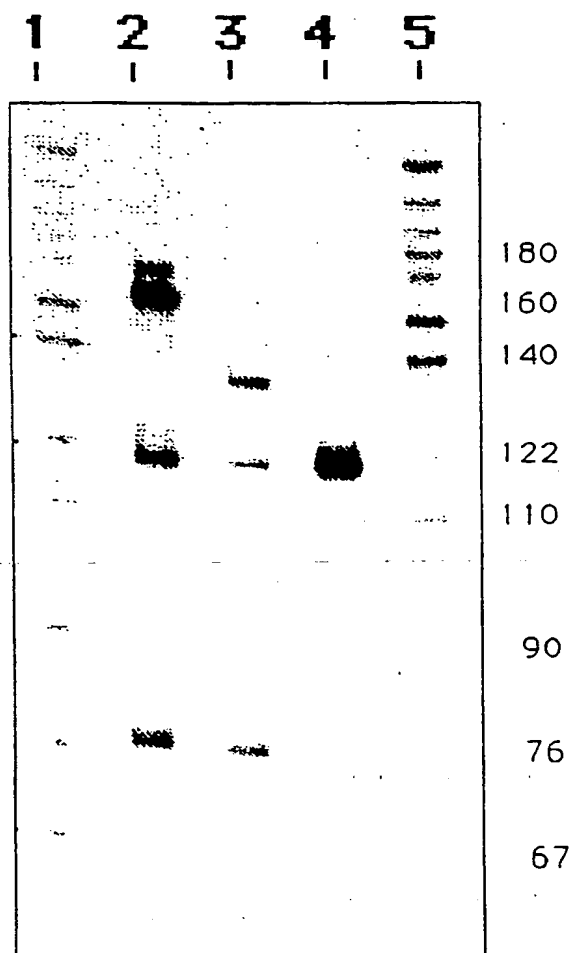


FIG. 17



Bahn 1 und 5: Molekulargewichtsmarker  
 Bahn 2: RibtRNA HP + 5S RNA ( Inj. Konz. 20:1 )  
 Bahn 3: RibtRNA C + 5S RNA ( Inj. Konz. 1:1 )  
 Bahn 4: RibtRNA D + 5S RNA ( Inj. Konz. 20:1 )

FIG. 18.



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 10 4701

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
D,X	THE EMBO JOURNAL, Band 6, Nr. 10, 1987, Seiten 3043-3047, IRL Press Ltd, Oxford, GB; P.A. JENNINGS et al.: "Inhibition of SV40 replicon function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III" * Insgesamt * ---	1,4,5-8 ,11-13, 16-34	C 12 N 15/11 C 12 N 9/00
Y	IDEM ---	2,3,8, 14	
D,Y	NATURE, Band 334, 18. August 1988, Seiten 585-591; J. HASELOFF et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities" * Insgesamt * ---	2,3,8, 14	
A	BIOTECHNIQUES, Band 6, 1988, Seiten 958-976; J.N.M. MOL et al.: "Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences: an overview" ---		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
A	WO-A-8 804 300 (UNIVERSITY PATENTS, INC.) ---		C 12 N
A	SCIENTIFIC AMERICAN, Band 255, Nr. 5, November 1986, Seiten 76-84, New York, US; T.R. CECH: "RNA as an enzyme" ---		
P,X	THE EMBO JOURNAL, Band 8, Nr. 12, 1989, Seiten 3861-3866; M. COTTEN et al.: "Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo" * Insgesamt * -----	1-34	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 27-06-1990	Prüfer SKELLY J.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur		T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

PRO FORM (50) 01.02 (PMD)